

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
AO 4234

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

par

Mme Anny DARPAS

pour obtenir
le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : Absorption et exsorption d'éléments minéraux par les
tissus végétaux cultivés in vitro.

Soutenue le **29 MAI 1970**
Mai 1970

devant la Commission d'Examen

MM. GAUTHERET Président

DUCET
HELLER Examineurs
THELLIER

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
AO 4234

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

par

Mme Anny DARPAS

pour obtenir
le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : Absorption et exsorption d'éléments minéraux par les
tissus végétaux cultivés in vitro.

Soutenue le Mai 1970

devant la Commission d'Examen

MM. GAUTHERET Président

DUCET
HELLER Examineurs
THELLIER



Ces recherches ont été effectuées au laboratoire de Physiologie Végétale de la Faculté des Sciences de Paris sous la direction de Monsieur le Professeur HELLER. Je suis heureuse que la rédaction de ce volume m'offre l'occasion de lui exprimer ma profonde gratitude pour les conseils précieux qu'il m'a prodigués tout au long de ce travail et pour l'appui que j'ai trouvé auprès de lui depuis le début de ma carrière.

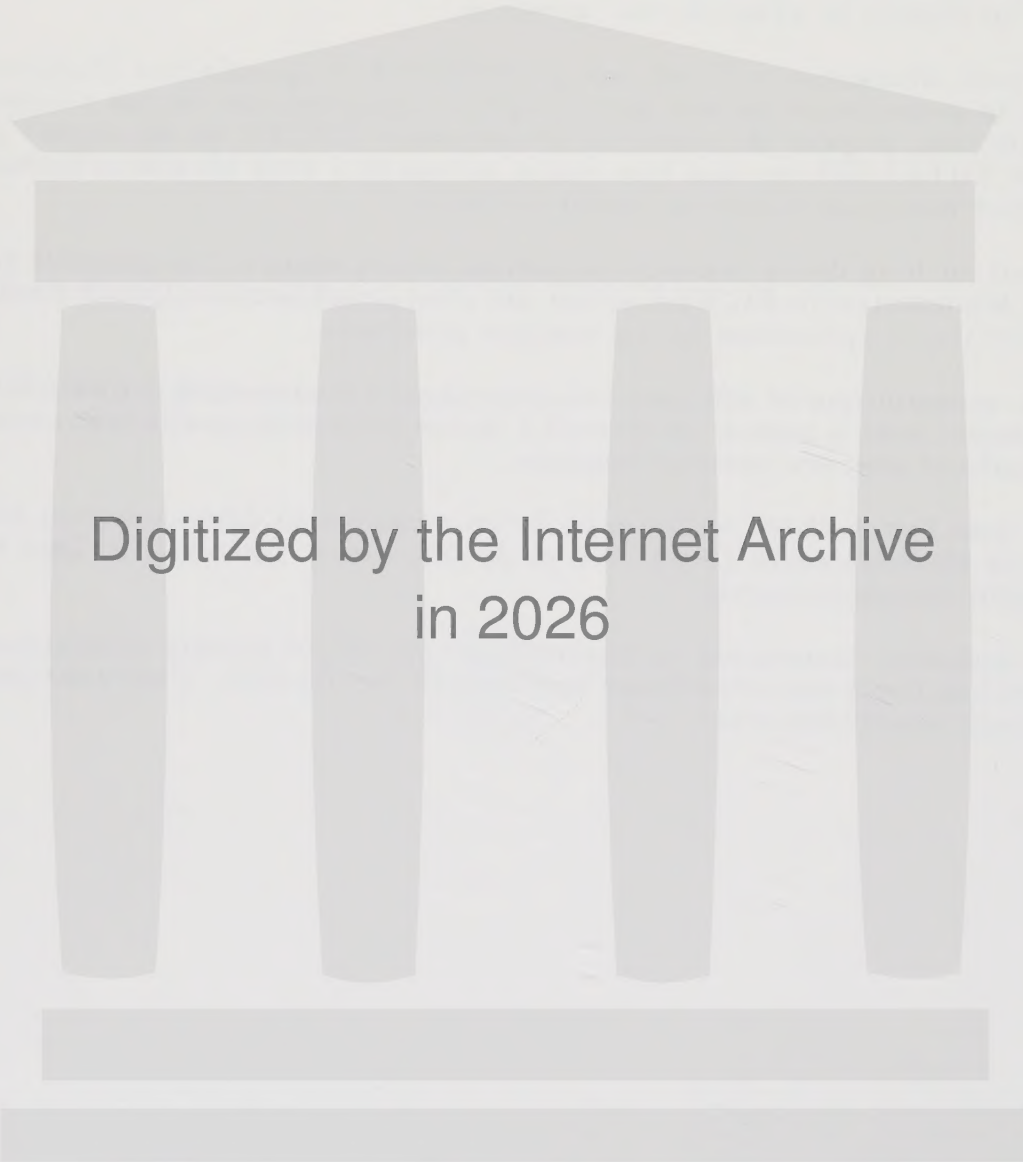
Je prie Monsieur le Professeur GAUTHERET qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon Jury d'agréer l'expression de ma respectueuse gratitude. Je prie Monsieur le Professeur DUCET et Monsieur le Professeur THELLIER qui ont bien voulu accepter d'être Membres de mon Jury d'agréer mes plus sincères remerciements.

Tout au long de ce travail, le patient dévouement et les conseils judicieux de Mademoiselle RICHEZ m'ont été d'un grand secours. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

La sympathique et efficace collaboration de Mademoiselle PENNARUN m'a grandement aidé à mener ce travail à bonne fin. Qu'elle veuille bien croire à mon amicale et sincère reconnaissance.

Je dois les qualités techniques de ce mémoire au dévouement et aux capacités de Mademoiselle LECLERE et de Monsieur BRIAND. Je leur en suis vivement reconnaissante.

A tous mes camarades de laboratoire qui m'ont permis d'effectuer ces recherches dans une excellente atmosphère de travail, j'adresse mes plus cordiaux remerciements.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550210_0014

INTRODUCTION

Le mécanisme par lequel les plantes absorbent les éléments minéraux est encore très mal connu, malgré de très nombreuses recherches. Les phénomènes physiques, l'entraînement par l'eau, la diffusion selon les lois de Fick ou de Donnan, l'électro-osmose, les échanges d'ions adsorbés ont été tour à tour invoqués ; puis devant l'impossibilité de rendre compte de tous les faits par ces seuls facteurs, on fit appel à des théories métaboliques, dont la plus élaborée reste celle des transporteurs (EPSTEIN, 1953), selon laquelle les ions seraient pris en charge par des vecteurs de nature enzymatique. Mais comme nous le verrons cette théorie non plus n'est pas entièrement satisfaisante.

Pour étudier valablement l'absorption il fallait d'abord la séparer des autres processus qui dans la plante supérieure lui sont associés : migration vers les parties aériennes et incorporation dans des tissus en croissance. Aussi pendant longtemps a-t-on dû se contenter d'expérimenter sur les algues, dont les vacuoles étaient assez importantes pour fournir des volumes suffisants de suc vacuolaire analysables par les moyens chimiques ordinaires. L'emploi des radio-isotopes, utilisés dans les études de l'absorption dès 1935 (HEVESY), puis l'appel à des techniques physico-chimiques particulièrement sensibles (spectrophotométrie de flamme, absorption atomique) ont permis l'étude de l'absorption sur des racines excisées et plus récemment sur des tissus cultivés in vitro et même sur des cellules isolées (GRIGNON et SALSAC, 1969).

C'est sur des tissus cultivés in vitro que portent les présentes recherches. De croissance négligeable pendant la durée des expériences, peu différenciés, ils constituent un matériel de choix. De plus, mis en présence de milieux définis, ils permettent d'observer non seulement l'absorption, mais le phénomène inverse ou exsorption. Or celle-ci dont l'analyse est pourtant d'un grand intérêt pour la connaissance de l'absorption elle-même, a été jusqu'ici relativement peu étudiée.

La plupart des tissus exigent de l'auxine pour une croissance in vitro satisfaisante. Cependant ils peuvent plus ou moins s'en passer au prix d'une forte réduction de croissance, tandis que d'autres, tumoraux ou anergiques, peuvent parfaitement croître sans auxine, comme le font les racines isolées. Nous disposons donc là d'un matériel particulièrement favorable à l'étude de l'action de ce facteur de croissance sur l'absorption. Or plusieurs auteurs ont soupçonné que l'auxine, substance de corrélation aux potentialités multiples devait agir sur l'absorption. Malheureusement leurs résultats furent des plus contradictoires et doivent être revus.

Enfin, troisième direction où l'emploi des cultures de tissus peut être source d'observations intéressantes : celui de l'influence de la nature colloïdale du support sur l'absorption. Depuis les travaux de JENNY et OVERSTREET (1939) divers auteurs ont mis l'accent sur le rôle des colloïdes et des échanges d'ions adsorbés qu'ils permettent. Mais l'importance du phénomène a donné lieu à des discussions. La possibilité de cultiver les tissus soit sur gélose ou silico-gel, soit sur un milieu liquide (HELLER, 1953) permet de reprendre cette question en toute rigueur.

En définitive, l'étude de l'absorption que nous avons poursuivie sur les cultures de tissus s'est déroulée autour de trois thèmes principaux:

- l'absorption et l'exsorption par les tissus isolés de Carotte ;
- l'action de l'auxine sur les échanges, étudiée parallèlement sur les tissus normaux et tumoraux et sur les racines isolées ;
- l'influence des colloïdes sur la croissance et l'absorption minérale des colonies.

Les résultats obtenus dans ces directions seront groupés en trois chapitres, précédés des indications bibliographiques et techniques nécessaires et complétés par une discussion générale qui les situe dans le cadre général de la compréhension des phénomènes de l'absorption ionique.

HISTORIQUE

Pour disposer de termes de comparaison valables, nous ne nous limiterons pas aux quelques résultats obtenus en culture de tissus, mais nous envisagerons aussi les principaux travaux relatifs aux plantes entières et concernant les trois thèmes de recherche que nous avons suivis.

I - ABSORPTION et EXSORPTION

En 1939, STEWARD et HARRISON, étudiant l'absorption du bromure de rubidium par des disques de Pomme de terre, constataient l'existence d'une première phase rapide et de courte durée, suivie d'une seconde phase plus lente, mais plus constante, surimposée à la première.

Un grand nombre de chercheurs travaillant sur d'autres matériels et notamment les racines isolées, ont abouti avec divers éléments aux mêmes conclusions, par exemple STILES et SKELDING (1940), MACHLIS (1944), BUTLER (1953), HANSON et BONNER (1954), EPSTEIN et LEGGETT (1954). La première phase est aisément réversible, peu sensible à la température et persiste en présence de poisons respiratoires. La seconde, au contraire, est irréversible, présente un coefficient de température élevé et disparaît en présence d'inhibiteurs du transport d'électrons ou de découpleurs de la phosphorylation oxydative. La première phase, qualifiée de passive, intéresse un volume cellulaire pour lequel HOPE et STEVENS (1952) ont suggéré le terme d'espace libre apparent ("apparent free space" ou AFS), concept plus cinétique qu'anatomique en raison des difficultés que présente sa localisation. BRIGGS et ROBERTSON (1957) proposèrent une séparation abstraite de l'"apparent free space" en "water free space" où la concentration des ions devient rapidement égale à celle de la solution externe, et en "Donnan free space" contenant une haute concentration d'anions non diffusibles. Des échanges d'ions peuvent également intervenir lors de cette première phase (BROYER et OVERSTREET, 1940 ; SKELDING et REES, 1952 ; RUSSEL et AYLAND, 1955 ; DAINY et HOPE, 1959).

Lorsque l'on transporte un tissu d'une solution concentrée dans une solution moins concentrée, on constate une sortie d'ions que nous appellerons avec HELLER (1962) exsorption. Pour la plupart des auteurs, il s'agit d'un processus passif n'intéressant que la partie réversible de l'absorption. LUNDEGÅRDH, en 1959, paraît finalement moins intransigeant, il laisse supposer qu'un courant de diffusion peut s'établir aux dépens des ions précédemment accumulés, lorsque la plante est maintenue suffisamment longtemps dans l'eau distillée. La même année, EMMERT constate que le phosphore marqué fourni par voie foliaire est exsorbable et que la quantité exsorbée augmente de façon exponentielle avec la concentration en phosphore non radioactif du milieu baignant les racines, d'où l'éventualité d'un échange isotopique.

Plus récemment GABET et HELLER (1962) estiment que le phosphore exsorbé par des racines de plantules de Soja peut non seulement provenir de l'espace libre, mais aussi être endogène et organique. Ils insistent ainsi sur le caractère physiologique de l'exsorption et envisagent la participation du métabolisme.

Quant à la seconde phase de l'absorption, elle est fort complexe et a fait l'objet de nombreuses théories. En 1925, LAPICQUE émet l'hypothèse d'un vecteur protéique dont le caractère amphotère explique qu'il soit alternativement accepteur (au contact du milieu extérieur) et donneur de cation (au contact du suc vacuolaire). OSTERHOUT (1931, 1952) a introduit le concept d'un transporteur spécifique assurant le passage de l'ion à travers une barrière de diffusion, avec l'aide directe ou indirecte de l'énergie métabolique. LUNDEGÅRDH (1954) identifie les vecteurs des anions aux cytochromes de la chaîne respiratoire. En 1953, EPSTEIN applique à l'absorption les méthodes de l'enzymologie ; la nature hyperbolique des courbes est interprétée comme la preuve de l'existence de transporteurs. Le mécanisme de transfert sera ensuite résolu en deux systèmes. Cette hypothèse des deux systèmes, pour le transport des ions trouve son point de départ dans la complexité de la courbe de vitesse d'absorption en fonction de la concentration : cette courbe se compose de deux branches hyperboliques superposées, qui sont donc attribuées à deux transporteurs différents (EPSTEIN, 1966).

Mais l'existence des transporteurs est actuellement remise en cause. SCHAEDEL et JACOBSON (1965) ont montré que l'absorption du potassium par les chlorelles comporte une adsorption rapide suivie d'une diffusion lente vers l'intérieur, la quantité de cations accumulés dépendant de la quantité d'acides organiques non diffusibles synthétisés dans la cellule. THELLIER (1968) propose une théorie "électro-cinétique" de l'absorption construite sur les propriétés semi-conductrices des protéines et montre qu'elle peut donner de meilleurs résultats que la théorie des deux transporteurs. GRIGNON (1969) sur des suspensions cellulaires d'Erable, SALSAC sur des racines isolées de Lupin et de Féverole (GRIGNON et SALSAC, 1969) ont mis en évidence sur la courbe d'absorption l'existence d'un certain nombre de points d'inflexion qu'ils expliquent en admettant que l'ion pénètre dans une zone colloïdale par migration sur des sites chargés qu'il doit saturer avant de pouvoir les franchir et accéder à la vacuole.

Il semble donc que l'absorption puisse s'expliquer, au moins partiellement, en termes physiques simples, mais le nombre d'espèces ioniques présentes dans la cellule et leurs interactions rendent le phénomène complexe.

II - INFLUENCE DE L'AUXINE SUR LES ECHANGES

En 1938, SKOOG, BROYER et GROSSENBACHER constatent qu'après application d'AIA (acide β indolyl-acétique) à des tiges décapi-tées de Pois et de Solèil, la guttation et la concentration du liquide ex-sudé son accrues, ce qui laisse supposer une action de l'AIA sur l'ab-sorption radiculaire.

Puis, COMMONER et MAZIA (1942) dont les résultats furent confirmés par ceux de HIGINBOTHAM, LATIMER et EPPLEY (1953) ont observé que l'entrée d'eau due à l'action de l'auxine est accompagnée par une augmentation de l'absorption des ions.

Pour BRUNSTETTER, MYERS, MITCHELL, W.C. STEWART et KAUFMAN (1948), l'AIA entraînerait une accumulation des éléments minéraux à l'exception du calcium. Ils observent, en effet, sur des plan-tules traitées par application de cette substance sur les entre-nœuds, que les concentrations en potassium, magnésium, manganèse, bore et plus tardivement en phosphore, puis en cuivre, en fer et en aluminium sont accrues. Cette notion tend alors à devenir classique (DAVID, 1952).

Par contre, HELLER (1953) pense que l'accroissement de la teneur en potassium qu'il observe sur les cultures de tissus, peut n'être qu'une conséquence de l'action sur la croissance, et il estime pour sa part que les variations que peut provoquer l'auxine sur la nutrition mi-nérale sont de faible amplitude et difficiles à analyser.

Pour HANSON et BONNER (1954) l'action de l'acide 2,4-di-chloro-phenoxyacétique (2,4-D) sur l'accumulation des ions n'est qu'une conséquence de son effet sur l'hydratation des tissus.

ILAN (1962) sur des plantules d'*Helianthus annuus* a constaté que l'auxine a une influence inhibitrice sur l'entrée de l'ammonium et un effet stimulant sur celle du potassium.

CLAISSE (1962) sur des racines isolées de Pois note un effet dépressif sur l'absorption et une stimulation de l'exsorption pour le po-tassium et le phosphore.

Pour VAN STEVENINCK (1965) la présence de l'AIA dans le milieu où baignent des disques de tissus de Betterave favorise la sortie des éléments minéraux (potassium) quand les coupes sont fraîches ce qu' il explique en émettant l'hypothèse que l'action principale de l'auxine se-rait d'apporter un changement immédiat dans la perméabilité de la mem-brane quand le tissu est encore sensible.

HEATH et CLARK (1960) ont mis en évidence un antagonisme entre les auxines et certains chélateurs ce qui a amené PILET (1961) à penser que l'AIA jouerait un rôle dans l'absorption des ions comme agent

de déchélation. BELHANAFI (1964), pour sa part, s'il retrouve les résultats de HEATH et CLARCK, pense qu'ils représentent un argument insuffisant pour pouvoir affirmer que l'AIA agit par chélation, d'autant plus qu'il n'existe pas de preuves irréfutables de la formation de chélats entre les auxines et les métaux. Il démontre, par contre, que les chélateurs influencent le métabolisme auxinique.

YODA et ASHIDA (1960) ont montré sur des fragments de tiges de Pois étiolées que l'AIA modifie très rapidement (en moins de dix minutes) la pression osmotique avant que l'extensibilité des parois cellulaires ne soit modifié.

MASUDA et ses collaborateurs (1967, a, b) pensent que l'auxine agirait par l'intermédiaire de l'action stimulante qu'elle exerce sur la synthèse d'un RNA messenger, donc d'une protéine (cellulase ?).

UHRSTRÖM (1969) a mis en évidence l'influence très rapide de l'AIA (4 minutes) sur l'élasticité de la membrane ce qu'il explique par un relâchement de la structure primaire de cette membrane.

Ainsi l'influence de l'auxine sur la nutrition minérale apparaît-elle particulièrement délicate à analyser et a donné lieu à des résultats contradictoires et son étude mériterait d'être reprise.

III - INFLUENCE DE LA NATURE DU SUPPORT SUR LA NUTRITION MINERALE

Dans cette partie de notre travail, nous avons comparé les conditions de nutrition de colonies se développant présence d'une phase liquide (comme en aquiculture) ou d'un milieu colloïdal (milieu solidifié par la gélose ou un biogel).

La toxicité du milieu liquide pour les tissus ou organes isolés avait déjà fait l'objet des observations de plusieurs auteurs. En 1928, ULEHA l'avait signalée pour les cultures de cellules, puis PFEIFFER (1933), NIKLEWSKI (1933), MALYSHEV (1932), GAUTHERET (1935), FIEDLER (1936) la rencontrèrent pour les racines isolées, dont la croissance est moins rapide en milieu liquide qu'en milieu gélosé. GAUTHERET dès ses premières recherches sur la culture des tissus (1934) démontra que le contact d'un milieu aqueux exerce une action inhibitrice sur la prolifération du tissu cambial d'arbres.

RICHEZ (1965) a constaté que le renouvellement périodique du milieu liquide entraîne une augmentation de croissance pouvant atteindre 50 % de celle du témoin. Un transvasement périodique du milieu produisant le même effet, ce qui doit être attribué, semble-t-il, au brassage de l'atmosphère surmontant la culture. En outre, si l'on fait circuler, durant deux mois, un courant d'air aseptisé à la surface des tissus (milieu gélosé) le poids moyen des cultures est considérablement augmenté.

Tous ces faits concourent à suggérer l'existence, dans les cultures sur milieu liquide, d'un facteur limitant dont la cause réside dans l'altération de l'atmosphère du tube.

La notion d'échange de contacts, introduite par JENNY et OVERSTREET (1939) a mis l'accent sur l'importance des réactions d'échanges entre colloïdes du sol et de la racine. Elle suggère un mécanisme par lequel s'opérerait un transfert d'ions des particules du sol à la racine ou vice versa sans participation d'électrolytes libres. ELGABALLY et WIKLANDER (1962) étudiant l'absorption de l'anion Cl^- par les racines excisées, notent qu'en présence d'un système Cl^- -résine, l'absorption de l'ion chlore par des racines de Maïs est beaucoup plus importante à partir de la résine Cl^- qu'à partir du filtrat en équilibre avec ces résines.

De même, BLANCHET, CHAUMONT et STUDER (1962) ont montré l'importance du phénomène de contact racines-particules du sol dans l'alimentation phosphorique des plantes sur des sols synthétiques.

PALMADE (1967) a pu observer l'intense prolifération des tissus de tubercules de Topinambour (Helianthus tuberosus) sur bio-gels et l'influence très nette de la structure physique du gel sur cette prolifération.

HELLER (1953) ayant lui-même constaté le ralentissement de croissance qui affecte les colonies tissulaires cultivées à la surface d'un liquide (donc dans des conditions où l'asphyxie ne peut être en cause) a pu montrer que l'action stimulante de la gélose sur la croissance des tissus était une action de contact : une faible épaisseur de liquide, interposée entre le milieu gélosé et la colonie, suffit à la faire disparaître, inversement, une faible couche de gel interposée entre la solution nutritive et les tissus permet une croissance aussi active qu'un milieu gélosé homogène. Un résultat analogue a été obtenu dans le cas des silico-gels. De ces faits, on peut déduire que l'action exercée par la gélose (ou par les silico-gels) est due à la structure colloïdale engendrée au contact des tissus.

Cette observation permet de reprendre le problème sur de nouvelles bases. Il était intéressant de poursuivre l'étude de cette question en considérant non plus la croissance, mais la nutrition des tissus et en essayant d'analyser le mécanisme en cause.

TECHNIQUES UTILISEES

I - TECHNIQUES DE CULTURE

A) CULTURE DES TISSUS

Les expériences ont été réalisées sur des cultures de tissus de Carotte (souche isolée par GAUTHERET en 1937) et de Crown-gall de Scorsonère.

Milieu de culture

La solution nutritive employée est celle de HELLER (1953) pour les tissus de Carotte. Le même milieu sans auxine et avec cinquante grammes de glucose par litre (au lieu de trente) est utilisé pour les Crown-gall de Scorsonère.

Milieu de Heller

	mg/l	mM
KCl	750	10,06
NO ₃ Na	600	7,06
SO ₄ Mg, 7H ₂ O	250	1,03
PO ₄ H ₂ Na, 2H ₂ O ..	141	0,91
CaCl ₂ , 2H ₂ O	75	0,51
Cl ₃ Fe, 6H ₂ O	1	0,004
SO ₄ Zn, 7H ₂ O ...	1	0,003
BO ₃ H ₃	1	0,016
SO ₄ Mn, 4H ₂ O	0,1	0,0004
SO ₄ Cu, 5H ₂ O ...	0,03	0,0001
AlCl ₃	0,03	0,0002
NiCl ₂ , 6H ₂ O	0,03	0,00001
IK	0,01	0,00006
Glucose	30 g/l	
Vitamine B ₁	1 mg/l	
Acide β indolyl-acétique	0,5 mg/l	
Gélose	10 g/l	

Conditions de mise en culture

Les explantats sont disposés aseptiquement à la surface du milieu gélosé ou sur un support de papier filtre sans cendres reposant à la surface du milieu liquide. Les milieux sont autoclavés pendant 25 minutes à 0,5 atmosphère. Le repiquage s'effectue en salle stérile et la croissance dans une salle dont la température est maintenue à 18°. Au bout de deux mois de culture, nous obtenons des colonies pesant plusieurs grammes.

Dispositifs spéciaux

Pour étudier l'action exercée par des substances colloïdales sur le développement des colonies, nous avons utilisé pour solidifier le milieu, outre la gélose, des gels d'origine synthétique, de structure définie et connue : les bio-gels déjà utilisés par Melle PALMADE pour les tissus de Topinambour. Les bio-gels P sont des gels sphériques, copolymères de l'acrylamide et du méthylène acrylamide, constitués de grains poreux, hydrophiles, qui gonflent dans l'eau. La grosseur des grains, appréciée au tamis, peut varier. Les données de granulométrie correspondent au nombre de mailles (mesh) au pouce anglo-saxon (25,40 mm). Ainsi un bio-gel intitulé 100/200 mesh A.S.T.M. est composé de particules plus petites (diamètre compris entre 0,149 et 0,074 mm) qu'un bio-gel 50/100 mesh (diamètre compris entre 0,297 et 0,149 mm). Indépendamment du tamis, il existe différents types de bio-gels P : P₆, P₁₀, P₂₀₀...; ces indices représentent la limite d'exclusion du gel découlant du diamètre des pores internes des grains. Le bio-gel P₁₀ par exemple ne laisse passer que les substances de poids moléculaire inférieur ou égal à 10.000, le bio-gel P₂₀₀ celles dont le poids moléculaire est inférieur ou égal à 200.000. Les doses minimales retenues correspondent à celles permettant un début de gélification du milieu. Le gel se formant à froid, on pèse pour chaque tube la quantité de bio-gel voulue que l'on autoclave ou que l'on stérilise à l'éther. On ajoute ensuite 20 ml de milieu préalablement autoclavé.

Nous avons également utilisé les dispositifs très particuliers mis au point par HELLER (1953) :

1°) Dans l'un, le milieu gélosé est recouvert d'une mince couche de solution nutritive surmontée d'un support de papier-filtre, sur lequel est placée la colonie.

2°) Dans un autre, le milieu liquide est surmontée d'une mince couche de gélose maintenue grâce à un support de papier filtre et destinée à recevoir l'explantat.

3°) Le troisième, enfin, est analogue au précédent, mais au lieu de gélose, il comporte du silico-gel.

Ce dernier est préparé par la méthode mise au point par DASTE et HELLER (1951). Il suffit de mélanger à égalité de volume une solution de silicate de sodium à 20 % et une solution d'acide chlorhydrique à 7 %.

Le mélange doit être acide et le temps de prise compris entre 2 et 15 minutes : une prise trop lente indique un excès d'acidité, trop rapide, un excès de silicate ; il suffira après un essai préliminaire de modifier les proportions respectives des deux solutions.

Pesées aseptiques

Nous avons adopté comme critère de croissance des colonies, l'augmentation absolue de leur poids frais. Pour cela, nous avons utilisé la méthode mise au point par HELLER (1953). Elle consiste en une pesée aseptique des tissus, introduits à l'aide d'une pince dans un sachet de papier stérilisé.

B) CULTURE DES RACINES ISOLEES

Les racines sont obtenues à partir de germinations aseptiques de graines de Pois (Pisum sativum) variété Express Alaska.

Germination des graines

Après trempage d'une minute dans l'alcool à 95°, les graines sont plongées pendant trois heures et demi dans une solution d'hypochlorite de calcium à 35 g/l. Elles sont alors mises à germer, à l'obscurité et à 27°, sur coton hydrophile et papier filtre humidifiés dans des boîtes de Pétri stérilisées.

Mise en culture

Après quatre ou six jours, les racines mesurent environ deux centimètres. On procède à leur isolement en salle stérile. La racine sectionnée est déposée à la surface du milieu nutritif stérilisé (milieu de STREET, 1957) réparti dans des fioles de Fourneau à raison de 40 ml par fiole. On place les cultures à 27° et à l'obscurité. La longueur des racines est maximale entre 15 et 20 jours.

Milieu de Street

	mg/l	mM
$(\text{NO}_3)_2\text{Ca}, \text{H}_2\text{O} \dots\dots$	288	1,22
$\text{SO}_4\text{Mg}, 7\text{H}_2\text{O} \dots\dots$	739	3
$\text{NO}_3\text{K} \dots\dots\dots$	80	0,8
$\text{ClK} \dots\dots\dots$	65	0,8
$\text{SO}_4\text{Na}_2 \dots\dots\dots$	200	1,4
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}, \text{H}_2\text{O} \dots\dots$	19	0,12
$\text{IK} \dots\dots\dots$	0,75	0,005
$\text{Cl}_2\text{Mn}, 4\text{H}_2\text{O} \dots\dots$	7,05	0,04
$\text{SO}_4\text{Zn}, 7\text{H}_2\text{O} \dots\dots$	2,67	0,009
$\text{BO}_3\text{H}_3 \dots\dots\dots$	1,50	0,02
$\text{SO}_4\text{Cu}, 5\text{H}_2\text{O} \dots\dots$	0,021	0,00009
$(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2 \dots\dots\dots$	2,50	0,005
Vitamine B ₁	0,1	
Pyridoxine	0,1	
Acide nicotinique	0,5	
Glycocolle	3	
Saccharose..... 20 g/l		

II - TECHNIQUES DE DOSAGES

A) UTILISATION D'ISOTOPES RADIOACTIFS

Les corps radioactifs employés sont le ^{32}P , le ^{42}K , le ^{35}S , le ^{45}Ca .

Le ^{32}P est introduit sous forme de PO_4H_3 : livré sans entraîneur, il ne contient pratiquement pas de ^{31}P . Le marquage s'effectue donc simplement par addition d'une quantité convenable d'une solution mère. La période du ^{32}P est de 14,3 jours. Toutes les mesures peuvent donc être faites dans la même journée sans correction.

Le ^{42}K , au contraire du ^{32}P , est fourni avec entraîneur. La quantité de potassium introduite au marquage est connue et il suffit de compléter avec un sel de potassium non radioactif, contenu habituellement dans le milieu utilisé, pour avoir la concentration voulue. Etant donnée la très courte période du ^{42}K (12,5 heures) une correction de décroissance a été faite toutes les demi-heures (par le calcul).

Le ^{45}Ca a une période de 45 jours. Il est avec entraîneur. Le ^{35}S a une période de 87 jours. Il est sans entraîneur. Pour éviter l'auto-absorption importante dans le cas du soufre et du calcium, les échantillons végétaux desséchés aux infra-rouges sont broyés finement. Pour le soufre, 20mg de la poudre végétale sont placées dans une coupelle d'aluminium, puis étalés très soigneusement avec quelques gouttes d'alcool à 95°. Pour le calcium, les explantats sont minéralisés (minéralisation nitro-perchlorique). On mesure ensuite la radioactivité de la solution de minéralisation.

Les mesures de radioactivité se font à l'aide d'un compteur du type Geiger-Müller.

B) DOSAGE DU PHOSPHORE TOTAL

Nous avons utilisé pour le dosage du phosphore total, la méthode colorimétrique mise au point par DUCET et VANDEWALLE (1959) qui utilise la teinte jaune du phosphomolybdate d'ammonium isolé en milieu alcoolique.

La minéralisation est effectuée à l'aide du mélange sulfonitrique (MACHEBOEUF et DELSAL, 1943) :

Acide sulfurique	30 ml
Acide nitrique	40 ml

Dans une ampoule à décanter, on verse successivement :

x ml (au plus 10 ml) du minéralisat,
 H_2O q.s.p. 10 ml,
0,8 ml de SO_4H_2 (10 N),
2 ml de molybdate d'ammonium à 25 g/l,
5 ml d'alcool isobutylique pur.

Après une agitation de trois minutes, puis repos d'une minute, le liquide se sépare en deux phases :

- la phase supérieure est une solution isobutylique du phosphomolybdate d'ammonium,
- l'inférieure, aqueuse, renferme le phosphore organique.

Après lavage à l'acide sulfurique, la phase alcoolique est récupérée dans une fiole jaugée et complétée à 10 ml avec de l'alcool éthylique à 96°.

La lecture spectrophotométrique s'effectue à 375 mμ avec l'appareil de Jobin et Yvon. On étalonne l'appareil avec une série de solutions de concentration connue.

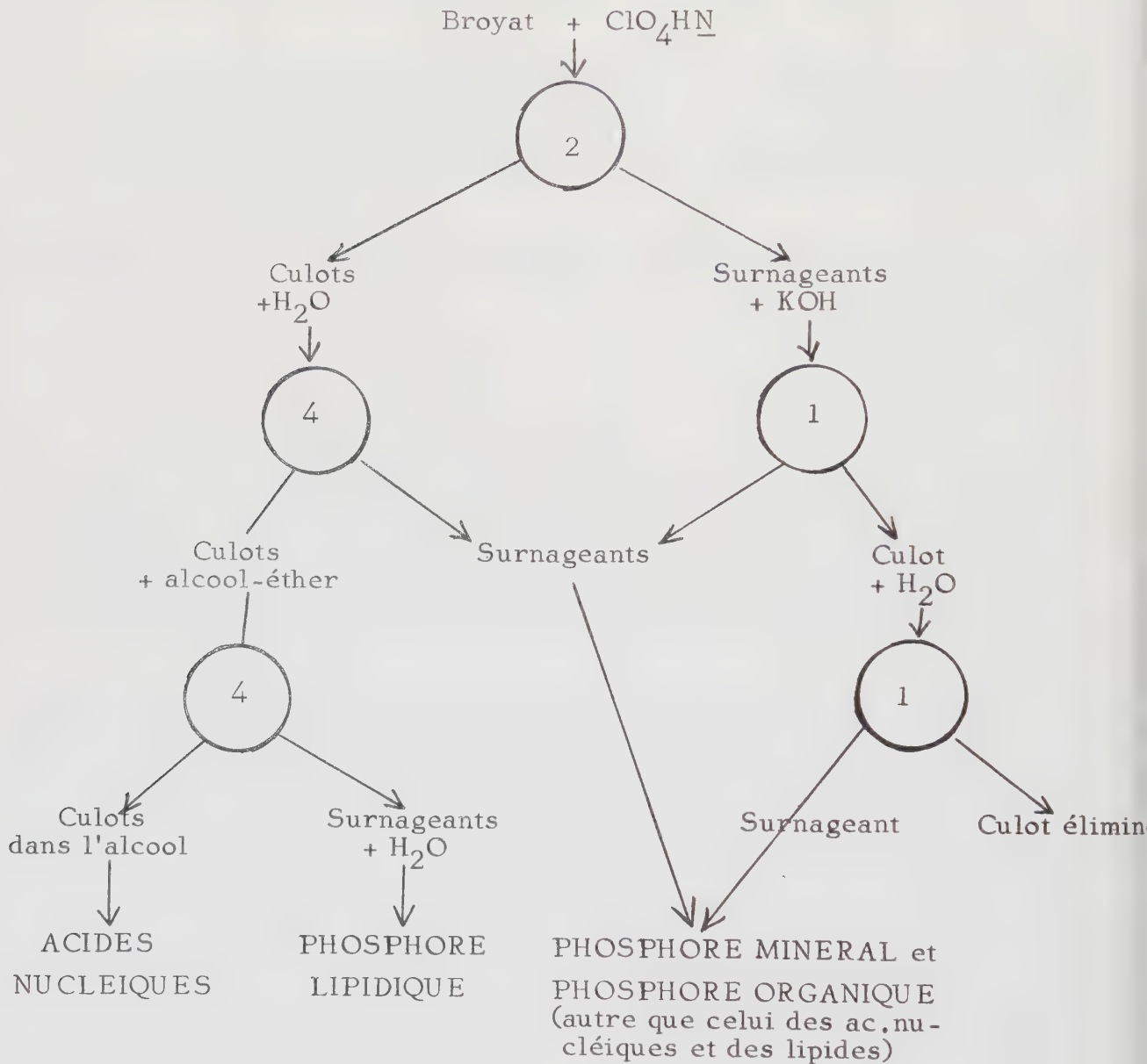
C) SEPARATION DES PRINCIPALES FORMES DE PHOSPHORE

Les colonies (ayant poussé sur un milieu marqué avec du ^{32}P) sont très finement broyées dans 3 ml d'acide perchlorique N avec un peu de sable et dans un bac à glace. On centrifuge pendant dix minutes. Le culot est repris par l'acide perchlorique et centrifugé à nouveau. Les surnageants sont neutralisés avec de la potasse à 20 % jusqu'au virage jaune et laissés au repos pendant une heure. Pendant ce temps, le culot est lavé quatre fois par centrifugation avec de l'eau distillée froide. Tous les surnageants sont réunis dans une fiole de 100 ml.

Le culot est alors mis en solution dans un mélange alcool-éther (trois parties d'alcool pour une d'éther) contenu dans un petit ballon surmonté d'un réfrigérant. On fait bouillir pendant un quart d'heure, puis on centrifuge. L'opération est répétée quatre fois. Tous les surnageants sont réunis dans une deuxième fiole de 100 ml et complétés avec de l'eau : on obtient le phosphore lipidique. Le culot est remis en suspension dans l'alcool : on obtient les acides nucléiques.

On reprend le surnageant neutralisé par la potasse et on sépare le précipité par centrifugation. Le surnageant est ajouté dans la première fiole de 100 ml. Le précipité est repris par un minimum d'eau et on centrifuge à nouveau. Le surnageant est versé dans la fiole de 100 ml et le précipité éliminé. Nous avons dans la fiole, le phosphore minéral et le phosphore organique que nous séparons par la méthode de DUCET et VAN DEWALLE (1959) exposée précédemment. Mais ici nous gardons les deux phases, la phase aqueuse contenant le phosphore organique et la phase alcoolique renfermant le phosphore minéral.

Séparation des principales formes de phosphore



 n nombre de centrifugations

D) DOSAGES DE CALCIUM ET DE POTASSIUM

1°) Minéralisation nitro-perchlorique

Nous avons utilisé la minéralisation nitro-perchlorique dont le principe fut établi par LEMATTE, BOINOT et KAHANE (1927).

Le mélange d'attaque est celui préconisé par GUILLAUMIN (1932):

Acide nitrique 100 ml

Acide perchlorique pur .. 40 ml

Mettre dans un matras 50 mg de tissus au contact de 10 ml de mélange nitro-perchlorique. Chauffer modérément au début, et évaporer ensuite jusqu'à une siccité peu poussée.

Le résidu sec, après refroidissement, est repris par l'eau, légèrement acidulée si l'évaporation est trop poussée et s'il ne reste dans les sels pas de traces d'acide suffisantes pour assurer leur dissolution.

2°) Spectrophotométrie de flamme

La solution est pulvérisée dans une buse par un courant d'air sous pression. Le brouillard, ainsi formé, est conduit sur une flamme où l'élément provoque la formation de raies caractéristiques que l'on isole à l'aide d'un filtre et dont on mesure l'énergie à l'aide d'une cellule photoélectrique. Pour éviter les interactions on utilise la méthode de la surcharge.

E) DOSAGE d'AZOTE

1°) Séparation de l'azote protéique

Les tissus desséchés sont d'abord réduits en une poudre fine par broyage au mortier puis traités par l'acide trichloracétique à 10% qui précipite les protéines. Le résidu est séparé par centrifugation puis récupéré dans des tubes de Folin-Wu.

Parallèlement aux dosages d'azote protéique, nous avons mesuré directement sur la poudre la quantité d'azote total.

2°) Minéralisation

On ajoute à 40 mg de poudre, 2 ml de SO_4H_2 R.P. et une pincée de catalyseur de DUMAZERT et MARCELET (au sélénite de mercure). Des solutions témoins de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ contenant entre 0 et 1500 μg d'azote par tube subissent le même traitement. Les tubes sont mis au bain de sable à 300° pendant toute une nuit. La minéralisation terminée, le contenu des tubes est dilué à 50 ml avec de l'eau distillée.

3°) Dosage

Une partie aliquote de chaque fraction (entre 0,5 et 2 ml) est prélevée dans un tube Lumétron et amenée à 7 ml avec de l'eau distillée. On ajoute 3 ml du réactif de NESSLER (solution de KOCH et McMEEKIN, 1924) et on agite. Une coloration jaune apparaît immédiatement. Au bout de quinze minutes, la densité optique de ces solutions est mesurée dans le violet (420 mμ).

III - MESURE DE L'INTENSITE RESPIRATOIRE

Les mesures de l'intensité respiratoire des colonies furent réalisées selon la technique manométrique de WARBURG.

Toutes les mesures sont effectuées à la température de 25° dans un appareil de WARBURG, selon les techniques classiques qui sont exposées en détail dans le manuel de UMBREIT, BURRIS et STAUFFER (1957).

Cependant pour éviter tout traumatisme aux colonies tissulaires, nous avons utilisé des fioles d'un modèle spécial, d'un volume de 60 ml. Ce type de fiole permet, grâce à un rodage amovible de grand diamètre, d'expérimenter sur une ou plusieurs colonies entières sans leur faire subir le moindre dommage.

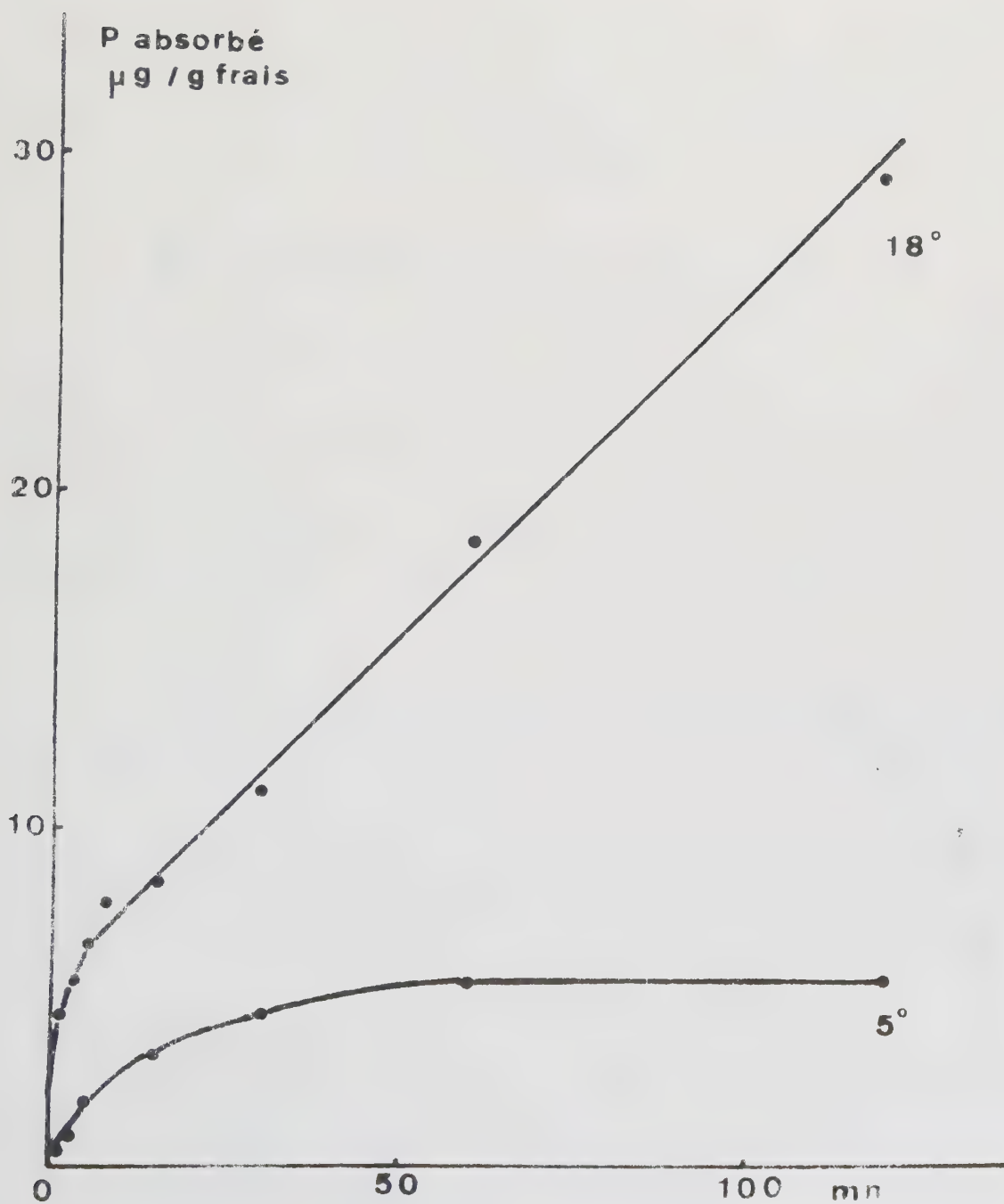


Fig.1. Absorption du phosphore par les
tissus de Carotte.

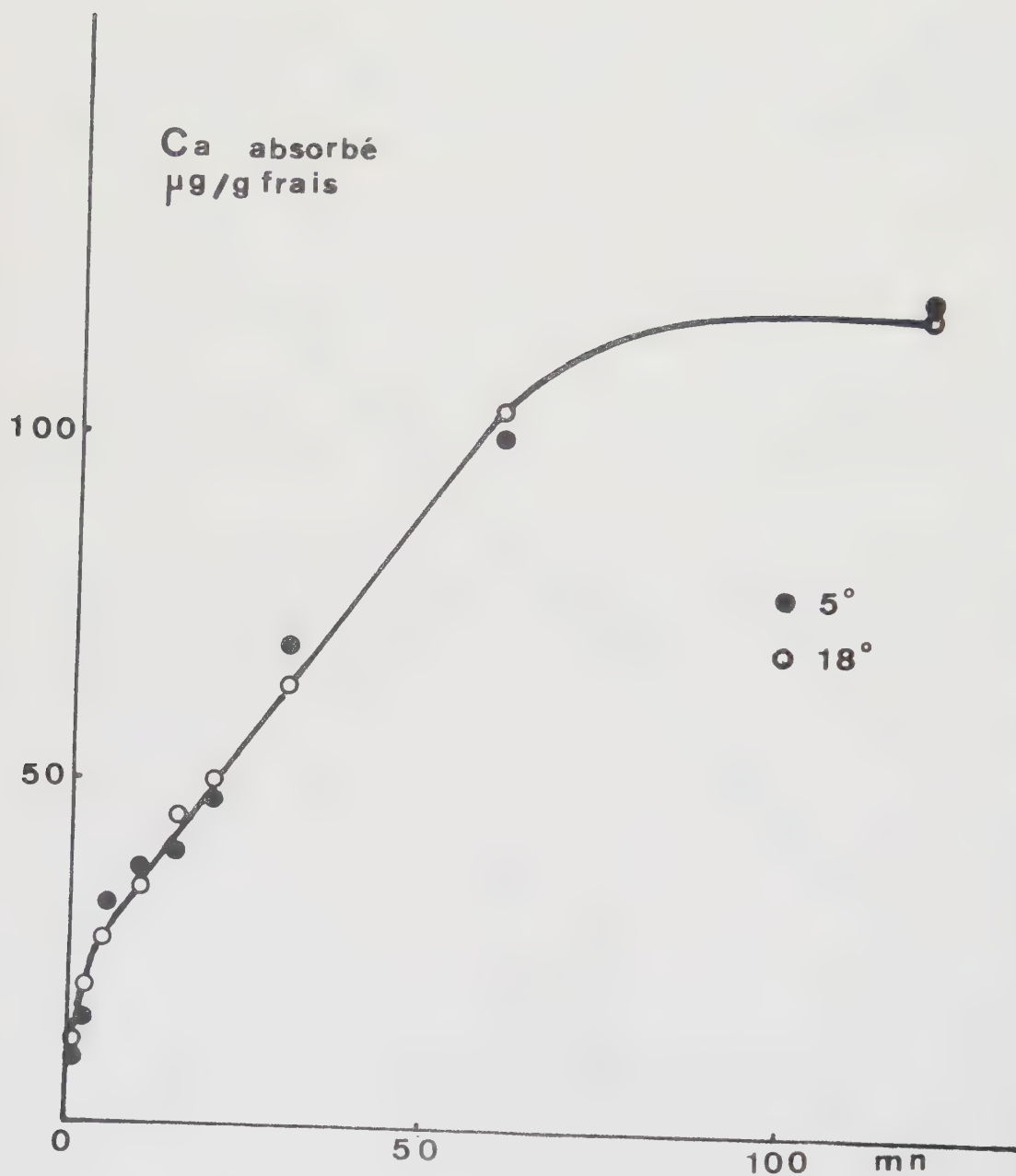


Fig. 2. Absorption du calcium par les
tissus de Carotte.

Première Partie

ABSORPTION et EXSORPTION

Une première étude a porté sur la cinétique de l'absorption du phosphore et du calcium par les tissus de Carotte. Nous avons ensuite abordé le phénomène moins étudié de l'exsorption en examinant l'influence sur cette fonction de divers facteurs : température, renouvellement et composition du milieu, présence d'inhibiteurs. Enfin, à partir de ces données, nous avons calculé la valeur de l'espace libre.

Chapitre I. - ETUDE DE L'ABSORPTION

A. Absorption du phosphore

Quarante-huit explantats de 180 mg absorbent dans 500 ml de milieu de HELLER aéré et marqué avec du phosphore radioactif (0,1 mCi par litre). Aux intervalles de temps indiqués, on prélève six explantats, on les essuie soigneusement entre deux feuilles de papier filtre et on mesure séparément leur radioactivité. Chaque point est établi sur la moyenne des six valeurs. L'expérience fut réalisée à 18° (température ambiante) et à 5° (bain de glace).

Résultats : figure 1.

Les quantités absorbées sont beaucoup plus importantes à 18° qu'à 5°. Après deux heures à 5°, les tissus ont absorbé ce qu'ils absorbent en trois minutes à 18°.

Les deux courbes commencent par une partie incurvée correspondant à une absorption rapide pendant les cinq premières minutes. A 18°, la courbe se poursuit par une portion rectiligne de pente beaucoup plus faible indiquant une absorption plus lente. Par contre à 5°, on aboutit à un plateau traduisant un arrêt de l'absorption.

B. Absorption du calcium

Le schéma expérimental est le même que pour le phosphore, mais ici en raison de l'auto-absorption très gênante pour les mesures de radioactivité, les explantats sont minéralisés.

Résultats : figure 2.

Les quantités absorbées à 18° et à 5° sont du même ordre de grandeur. Dans les deux cas, on aboutit à un plateau après soixante minutes d'absorption. Toutefois une discontinuité marquée vers la dixième minute suggère que cette absorption, bien que passive puisqu'insensible à la température se déroulerait en deux temps.

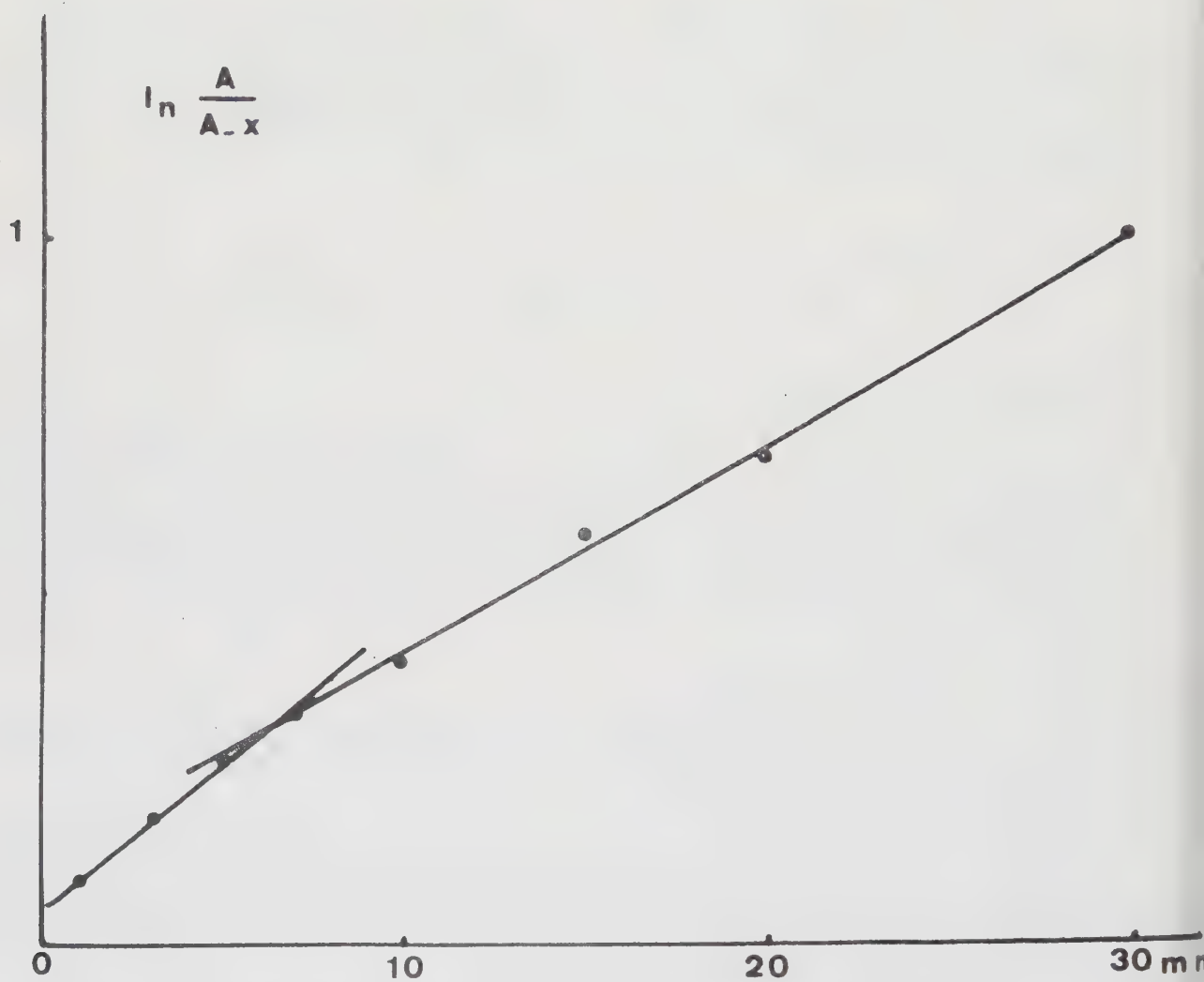


Fig. 2 bis. Absorption du calcium par les tissus
de Carotte.

C. Conclusion

1°) La courbe d'absorption du phosphore en fonction du temps présente deux parties : une absorption initiale rapide suivie d'une phase linéaire qui se prolonge pendant plusieurs heures. Ces deux phases ont déjà été signalées dans les tranches de tubercules et dans les racines excisées pour beaucoup d'autres ions : le rubidium (STEWART et HARRISON, 1939), le potassium et le manganèse (STILES et SKELDING, 1940), le strontium (EPSTEIN et LEGGETT, 1954), etc.

2°) L'absorption du calcium apparaît être largement passive, la courbe en fonction du temps ne présente plus que la phase initiale s'achevant par un plateau, ceci aussi bien à 5° qu'à 18°. En 1954, EPSTEIN et LEGGETT en étudiant l'absorption des ions alcalino terreux par les racines excisées d'Orge ont conclu à un transport actif du calcium par l'intermédiaire d'un processus métabolique. D'autres auteurs sont arrivés à la même conclusion, ce sont CHASSON et LEVITT en 1957 et plus récemment HANDLEY et OVERSTREET (1961), MAAS (1969). Par contre MOORE, JACOBSON et OVERSTREET (1961) ont montré sur des racines d'Orge excisées âgées de six jours que l'absorption du calcium est insensible aux basses températures et à l'action du dinitrophénol. SALSAC (1966) en faisant absorber du calcium à des racines excisées de Féverole et de Lupin obtient également une courbe se terminant par une asymptote horizontale correspondant à un taux de calcium constant. Pour expliquer l'existence d'une limite de la masse absorbée, cet auteur suppose que les ions calcium se fixeraient sur un nombre limité de sites d'absorption. La vitesse de pénétration serait alors proportionnelle au nombre de sites disponibles dans la racine ce qui permet d'écrire :

$$\frac{dx}{dt} = k (A - x)$$

$$\text{ou } \frac{dx}{A - x} = k dt$$

x, masse de calcium absorbée au temps t;
A, teneur maximale en calcium.

équation différentielle qui s'intègre immédiatement pour donner la relation :

$$\log \frac{A}{A - x} = kt,$$

Usant du même mode de représentation, nous retrouvons avec la même netteté (figure 2bis) l'existence de deux droites correspondant chacune à une phase distincte de l'absorption passive. Le phénomène signalé par SALSAC sur un matériel différent du nôtre apparaît donc général. De plus, les valeurs enregistrées pour les tissus de Carotte sont voisines de celles observées pour l'espèce calcicole (ou plus exactement non calcifuge) ce qui est bien en accord avec l'écophysiologie de la plante.

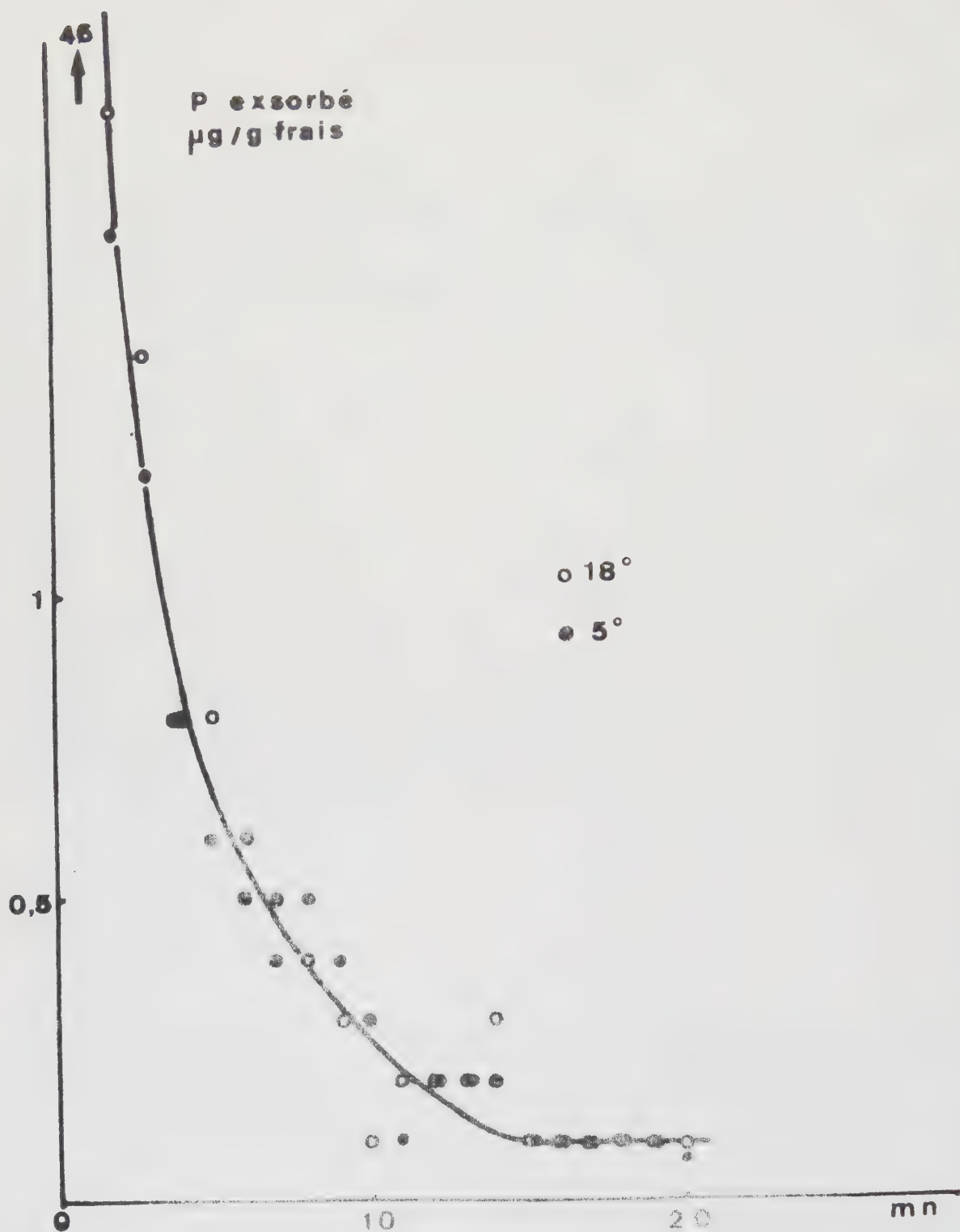


Fig. 3. Etude du départ du phosphore des tissus de Carotte (par élimination du film et par exsorption) au moyen d'une série de bains d'une minute chacun en milieu complet.

Chapitre II. - ETUDE GENERALE DE L'EXSORPTION

L'étude de l'exsorption peut s'effectuer de deux manières. La plus simple consiste à mesurer périodiquement la radioactivité d'un bain dans lequel séjourne un tissu ayant préalablement absorbé un élément radioactif.

Toutefois lorsque l'expérience se prolonge, une réabsorption partielle fausse les résultats. Aussi, pour éviter cette incidence, il est utile, à moins que l'on ne travaille à basse température, de renouveler à des intervalles fréquents les bains d'exsorption. C'est cette dernière méthode que nous utiliserons en général. Toutefois, dans ce chapitre, après avoir relaté une série de résultats en milieu renouvelé qui nous a permis de préciser la durée nécessaire du lavage, nous rapporterons quelques données en milieu non renouvelé qui nous fourniront des indications sur l'importance des échanges isotopiques.

A. Etude en milieu renouvelé et détermination du temps de lavage

Dix explantats ayant absorbé pendant deux heures dans un milieu complet marqué avec du ^{32}P (à raison de 0,3 mCi par litre) sont divisés en deux lots de cinq, l'un traité à 18° et l'autre à 5°. Les cinq explantats subissent des bains successifs toutes les minutes pendant les vingt premières minutes, toutes les cinq minutes ensuite dans 20 ml de milieu.

N.B. - Dans les expériences qui vont suivre les chiffres obtenus représentent des valeurs minimales puisqu'ils sont calculés à partir de l'activité du milieu de départ.

Résultats : figure 3.

Aux deux températures, les premiers bains présentent une radioactivité très forte qui diminue rapidement. Il est difficile de faire la part dans cette diminution de l'élimination du film de surface et de l'exsorption proprement dite.

Pour tenter de situer approximativement le moment où le premier phénomène devient négligeable, des essais de lavage furent effectués sur des tissus ayant baigné simplement quelques instants dans la solution radioactive en un temps trop court (dix secondes) pour que l'absorption soit importante. Les résultats sont consignés dans le tableau I.

On observe une forte radioactivité dans le premier bain correspondant au départ massif des ions de surface. Dans les suivants, la radioactivité diminue très vite pour devenir négligeable au delà de la 5ème minute. Compte tenu de l'intérêt qu'il y a à limiter le lavage au strict minimum nécessaire et du fait que nous opérons toujours dans les mêmes conditions, nous avons adopté un temps uniforme de lavage de 3 minutes : sans être entièrement supprimé, le phénomène parasite de l'élimination du film est assez faible pour que ses variations d'un lot à l'autre soient négligeables.

Tableau I

Lavage d'un explantat de 180 mg par des
bains successifs d'une minute chacun dans
15 ml de milieu complet

Temps/mn	Masse émise dans le bain	%/Total
1	6	82%
2	0,7	92%
3	0,3	96%
4	0,2	98,6%
5	0,05	99%
6	0,01	-
7	0,01	-
8	0,01	-
9	0,007	-
10	0,005	-
11	0,003	-
12	0	-
	7,3	
Résultats en ug par explantat		

Conclusion

En ce qui concerne l'exsorption elle-même, nous ne retiendrons pour l'instant que le fait qu'elle est insensible à la température. Sur ce point, les tissus isolés diffèrent des plantes entières (GABET et HELLER, 1962) pour lesquels l'exsorption est très sensible à la température, mais ils se rapprochent des racines excisées (VALLEE, 1963).

Cela semblerait indiquer que le caractère actif de l'exsorption, signalé par GABET et HELLER pour les plantules, a son origine au niveau de l'organisme végétal et non pas au niveau de l'organe ou de la cellule : dans l'organisme végétal le renouvellement de l'élément exsorbé peut se produire dans les cellules exsorbantes, à partir des autres parties de l'organisme et c'est ce renouvellement qui serait sensible à la température.

Au total, l'exsorption apparaît comme un phénomène essentiellement passif. Même en défalquant les quantités correspondant à l'élimination du film (4 premiers bains) les masses exsorbées restent importantes ; elles représentent au minimum le sixième de ce qui est absorbé en deux heures et semblent correspondre aux quantités absorbées pendant les cinq premières minutes.

B. Exsorption en milieu non renouvelé

L'exsorption fut ensuite étudiée en milieu non renouvelé. Chaque explantat - après trois lavages d'une minute chacun - exsorbe pendant trois heures dans 15 ml de milieu. Aux intervalles de temps indiqués, on prélève 1 ml de ce milieu dont on mesure la radioactivité et on ramène au volume initial par addition de milieu non marqué.

Pour corriger l'erreur introduite par la dilution effectuée après chaque prélèvement, on majore chaque mesure d'une correction égale au quinzième de la masse exsorbée jusqu'au moment du prélèvement (somme des coups précédents divisés par quinze). En raison de la réabsorption, les valeurs obtenues représentent l'exsorption brute (et non nette).

Résultats

a) Exsorption en milieu complet (figure 4). - Les courbes d'exsorption en fonction du temps présentent deux pics, l'un après 6 mn d'exsorption, l'autre après 60 mn.

La température a ici une action très nette. Les quantités exsorbées sont plus importantes à 5° qu'à 18°. La courbe d'exsorption à 18° se termine par un plateau, tandis que la courbe d'exsorption à 5° se poursuit par une montée progressive.

b) Exsorption en milieu sans phosphore (figure 5). - Chaque courbe comporte deux phases, l'une rapide et brève, l'autre plus lente et prolongée.

Les quantités exsorbées sont plus faibles qu'en milieu complet. L'action de la température est la même que celle observée précédemment.

c) Exsorption dans l'eau et dans un milieu où le phosphore est sous forme de phytate (figures 6 et 7). - Les résultats obtenus sont tout à fait comparables à ceux enregistrés en milieu sans phosphore.

Conclusion

En définitive, si nous comparons les résultats à ceux enregistrés en milieu renouvelé, nous constatons que l'influence de la température, visible seulement en milieu renouvelé, doit être attribuée à un effet sur la réabsorption.

Les pics observés en milieu complet disparaissent en milieu renouvelé ou en milieu non renouvelé ne contenant pas d'ions phosphoriques (eau, milieu sans phosphore ou avec phytate). Ces pics sont donc provoqués par des échanges isotopiques. Le fait qu'ils se manifestent à des moments bien précis après la mise en exsorption fait penser à l'existence de territoires d'échange distincts, successivement atteints par les ions venant de l'extérieur. Ces phénomènes ont probablement été accentués (ce qui nous a permis de les déceler) par le mode opératoire qui entraîne une dilution de la radioactivité et facilite la réabsorption.

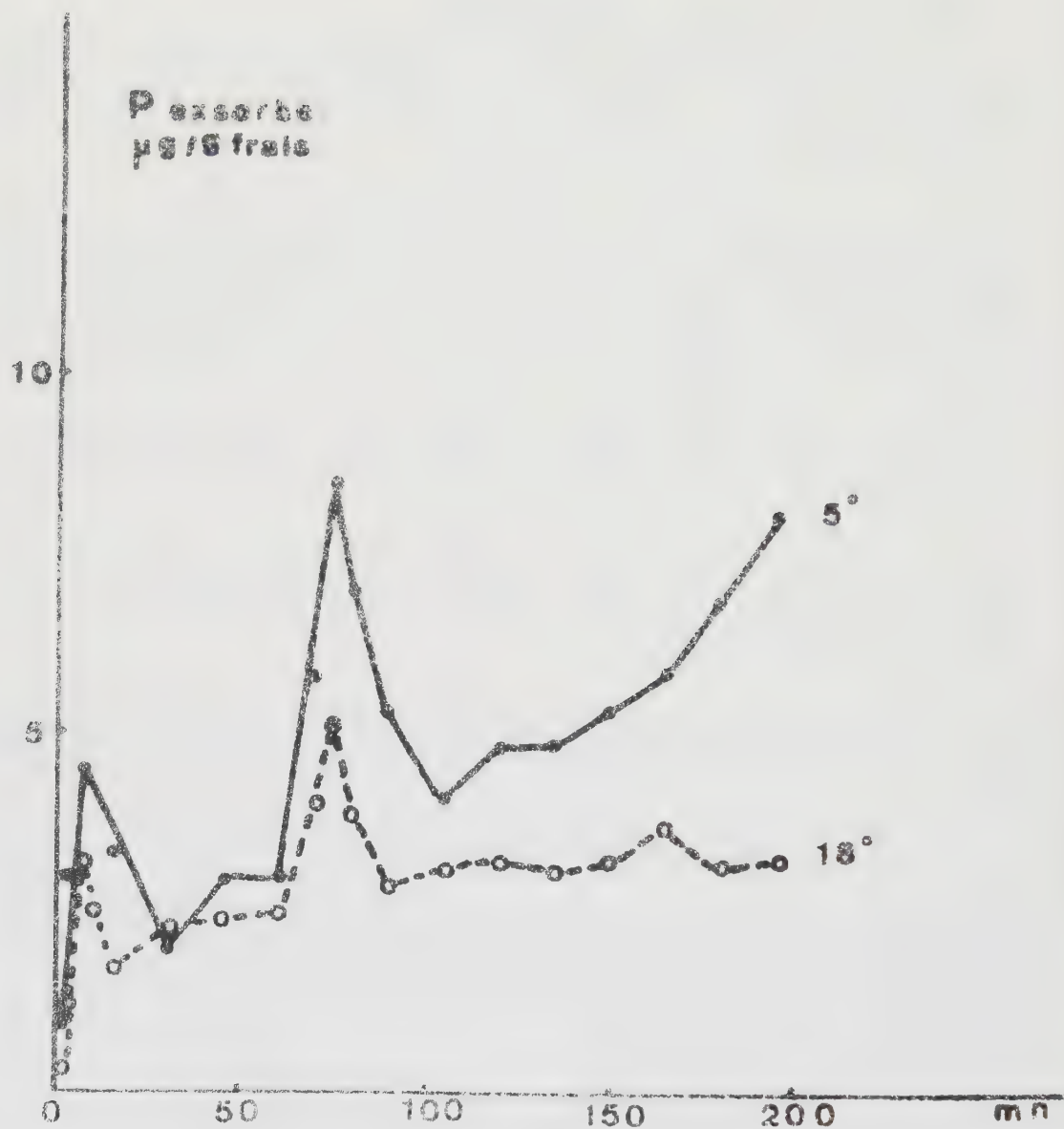


Fig. 4. Exsorption du phosphore par les tissus de Carotte en milieu complet.

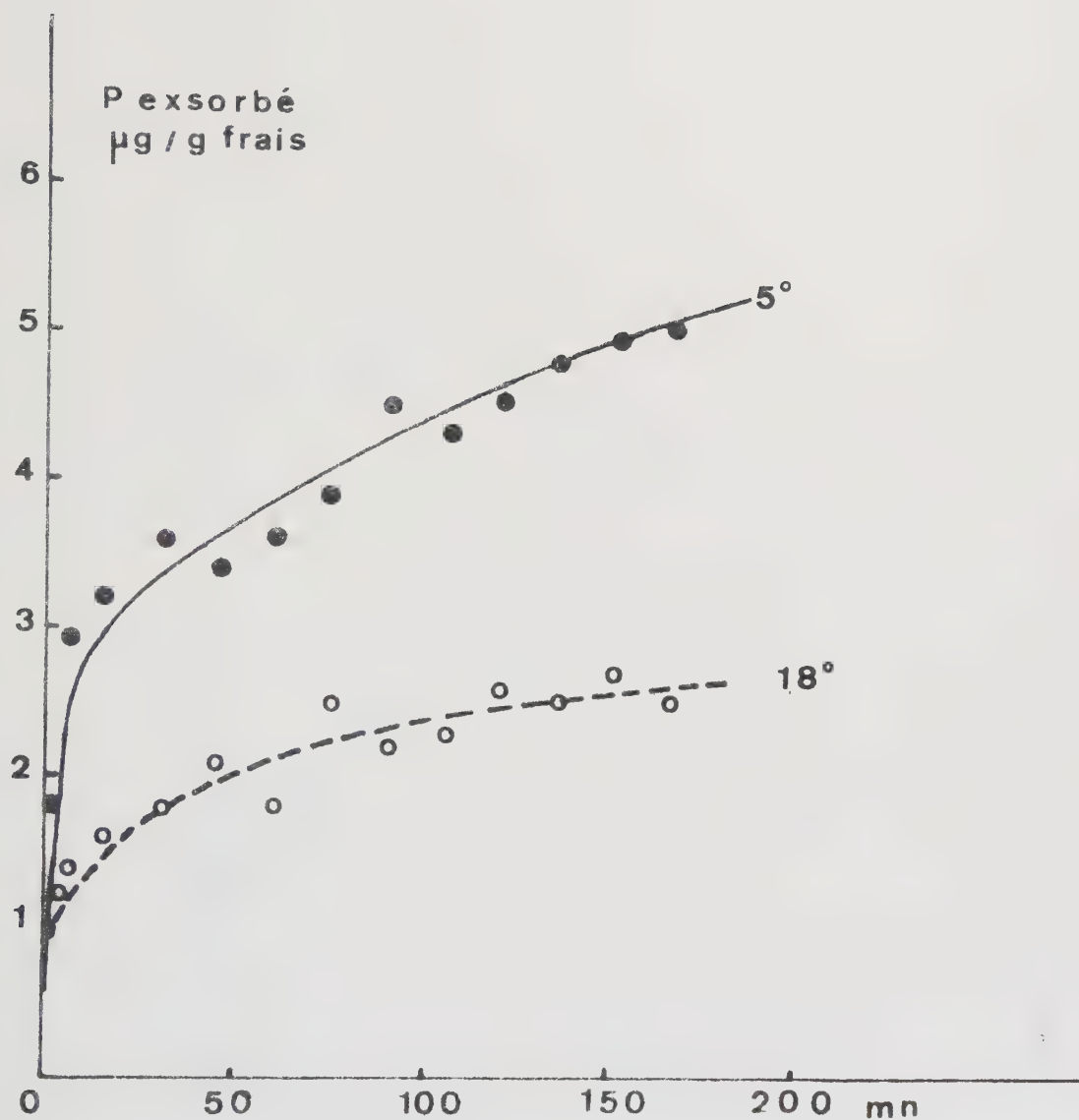


Fig.5. Exsorption du phosphore par les tissus de Carotte en milieu sans phosphore.

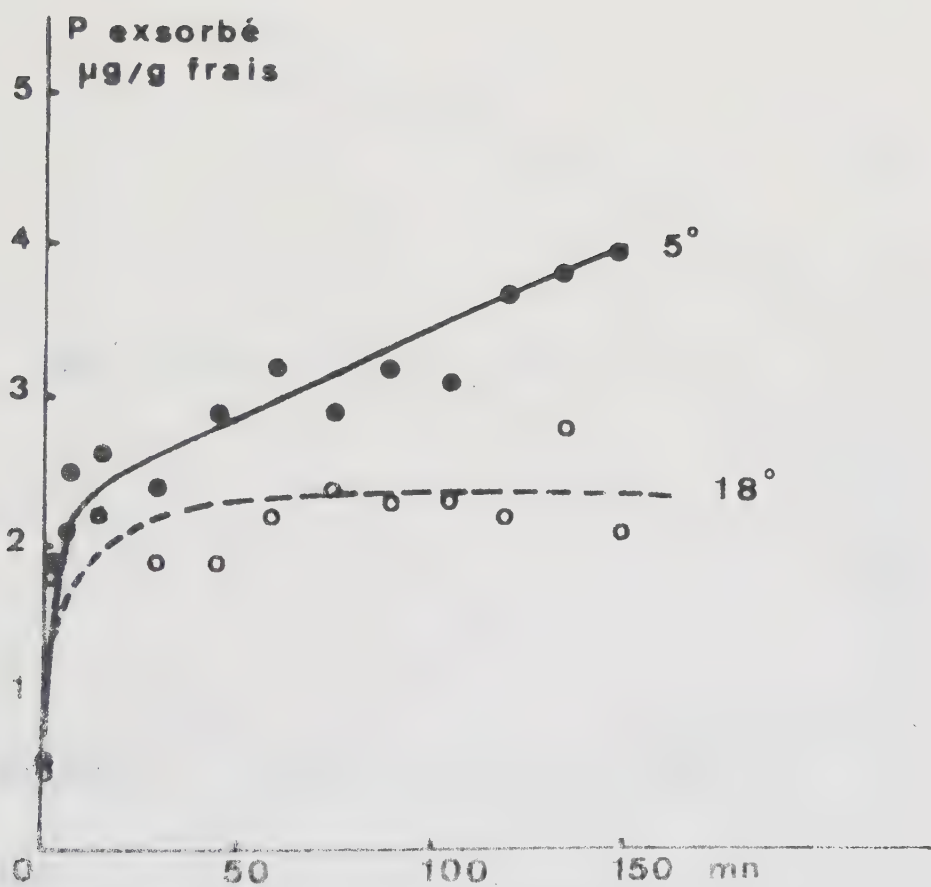


Fig.6. Exsorption du phosphore par les
tissus de Carotte dans l'eau.

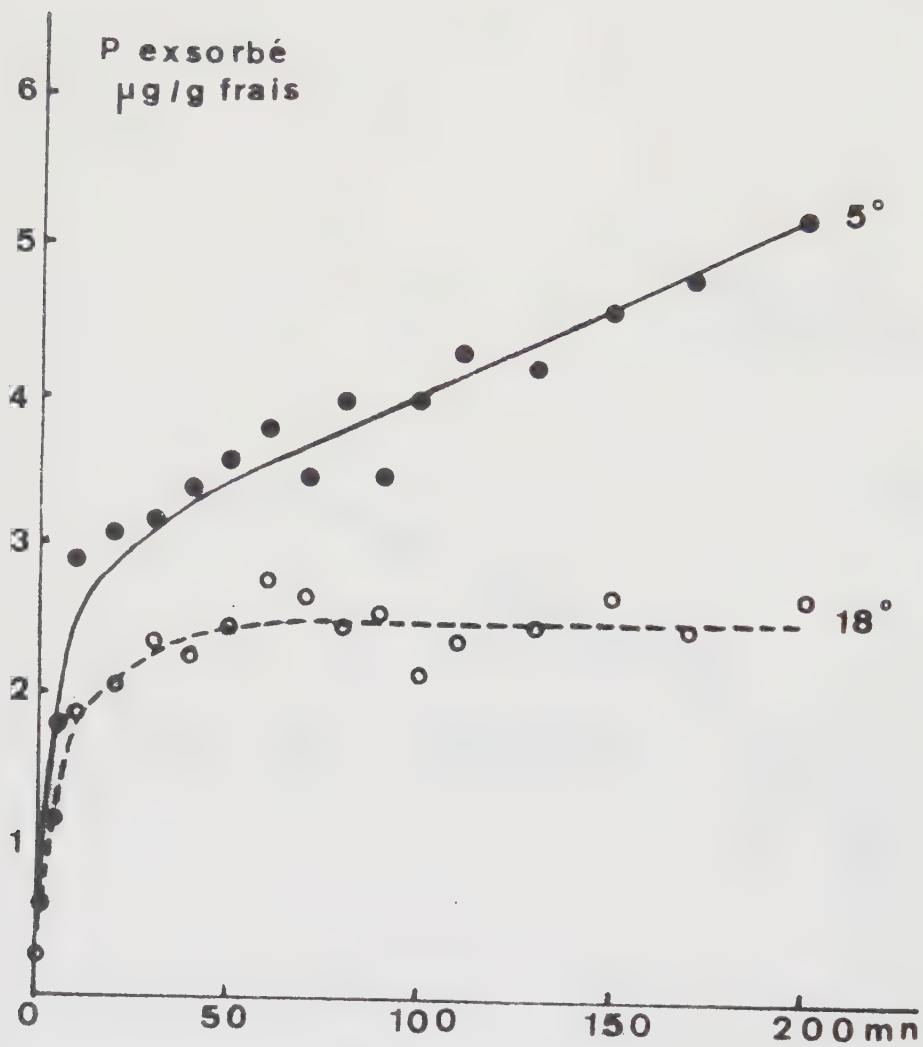


Fig. 7. Exsorption du phosphore par les
tissus de Carotte en présence
de phytate.

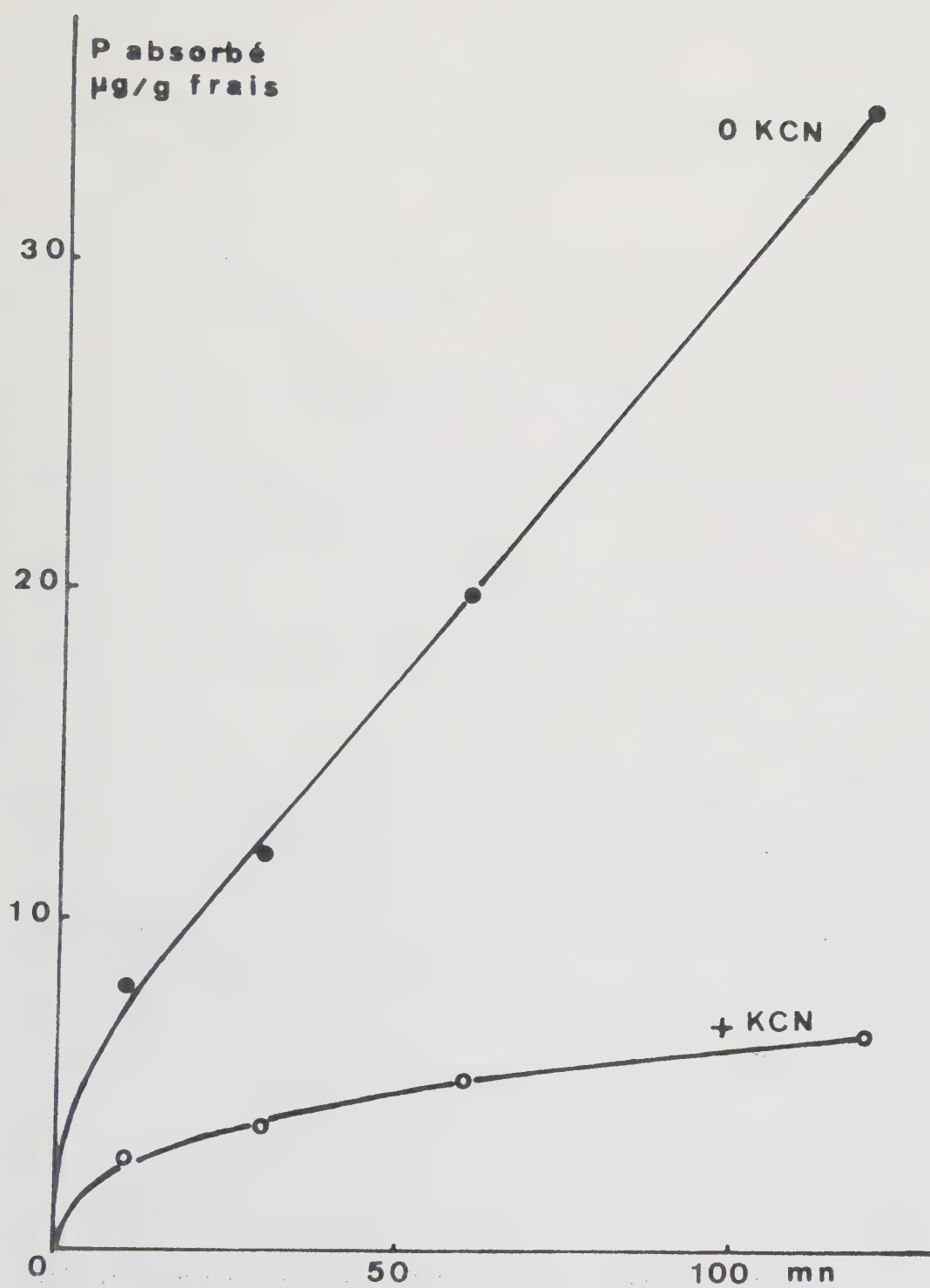


Fig.8. Influence du KCN sur l'absorption du phosphore par les tissus de Carotte.

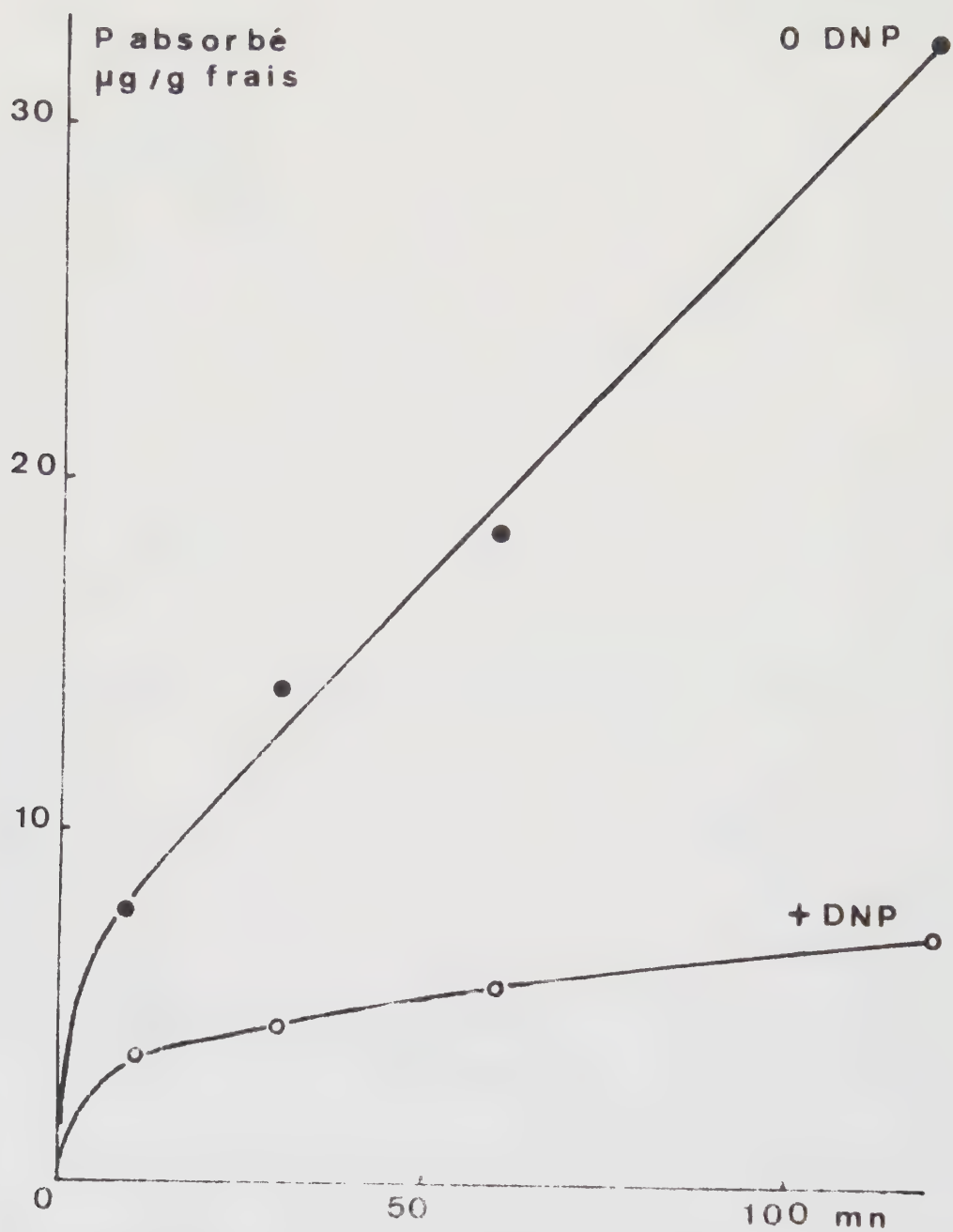


Fig.9. Influence du DNP sur l'absorption du phosphore par les tissus de Carotte.

Chapitre III. - INFLUENCE DES INHIBITEURS SUR L'ABSORPTION ET SUR L'EXSORPTION

Nous avons étudié l'influence sur l'absorption et sur l'exsorption de deux inhibiteurs du métabolisme oxydatif : le cyanure de potassium (KCN) et le 2,4-dinitrophénol (DNP).

A. Influence des inhibiteurs sur l'absorption

Deux lots de vingt colonies tissulaires absorbent dans 200 ml de milieu complet marqué avec du ^{32}P (0,1 mCi/l) en présence ou non de l'inhibiteur. Aux temps indiqués, on prélève cinq explantats, on les sèche et on mesure leur radioactivité.

Résultats : figure 8 et 9.

Aussi bien le cyanure de potassium que le 2,4-dinitrophénol inhibe l'absorption du phosphore, supprimant pratiquement l'un et l'autre toute absorption active.

B. Influence des inhibiteurs sur l'exsorption

Après avoir absorbé pendant deux heures dans 200 ml de milieu complet marqué avec du ^{32}P (à raison de 0,3 mCi/l) vingt colonies tissulaires sont divisées en quatre lots de cinq que l'on fait exsorber dans 20 ml de milieu sans phosphore, en présence ou non de l'inhibiteur, à 25° ou à 5°. Afin de réduire la réabsorption pour les témoins, les bains sont renouvelés toutes les dix minutes.

Résultats

a) Pour le cyanure de potassium (Tableau II).

Les quantités de phosphore exsorbées ne sont pas influencées par la présence du KCN (1 mM). Dans ces conditions, une expérience complémentaire fut réalisée en milieu non renouvelé pour voir si le KCN qui agit sur l'absorption modifie le bilan d'exsorption (Tableau III). Nous constatons qu'à 5° les quantités exsorbées sont les mêmes pour les témoins et les sujets traités ce qui confirme que le KCN n'a pas d'action sur l'exsorption. Si à 25°, les témoins exsorber en apparence moins que les sujets traités, c'est manifestement parce que la réabsorption est inhibée chez ces derniers.

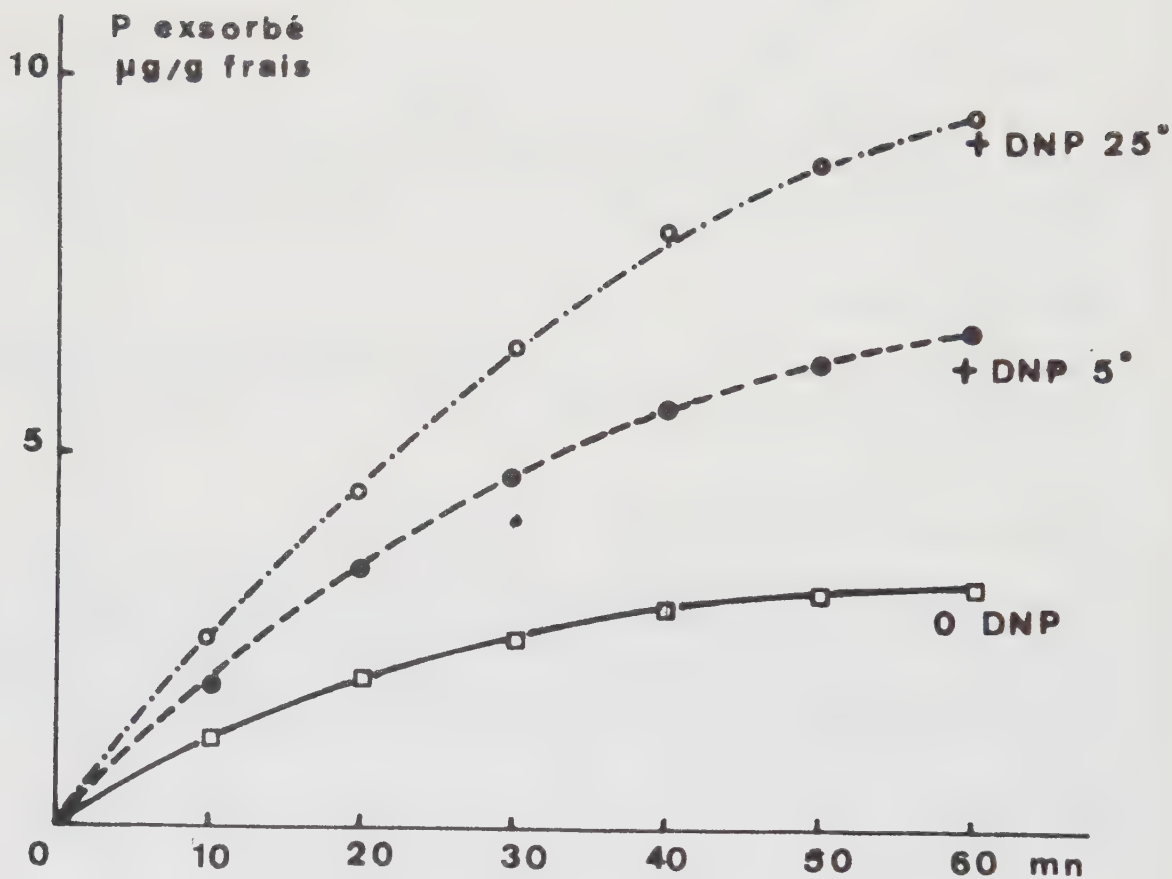


Fig.10. Influence du DNP sur l'exsorption du phosphore par les tissus de Carotte.

b) Pour le 2,4-dinitrophénol (figure 10).

Les quantités exsorbées en présence de DNP à 5° comme à 25° sont supérieures à celles des témoins : le DNP a donc au contraire du KCN une action positive sur l'exsorption. En outre, cette stimulation croît avec la température d'exsorption.

Tableau II

Influence du cyanure de potassium sur l'exsorption du phosphore marqué par les tissus de Carotte en milieu renouvelé
(résultats en μg de phosphore par gramme de matière fraîche)

Moments du renouvellement en mn	Sans KCN		Avec KCN (1mM)	
	5°	25°	5°	25°
10	1,2	1,2	1,3	1,2
20	0,8	0,6	0,8	0,6
30	0,5	0,7	0,6	0,6
40	0,4	0,2	0,2	0,2
50	0,2	0,1	0,2	0,1
60	0,1	0,1	0,1	0,1

Tableau III

Influence du cyanure de potassium sur l'exsorption du phosphore marqué par les tissus de Carotte en milieu non renouvelé. (Résultats en μg de phosphore par gramme de matière fraîche).

Temps en mn	Sans KCN		Avec KCN (1mM)	
	5°	25°	5°	25°
30	2,9	1,9	2,4	2,6
60	2,8	2,1	2,8	2,9
120	4,2	2,8	4,1	4,1

Nous avons obtenu les mêmes résultats avec le ^{42}K : figure 11. D'autres expériences ont permis de montrer que cette action n'est pas irréversible ; elle disparaît quand on supprime le DNP du milieu d'exsorption (Tableau IV).

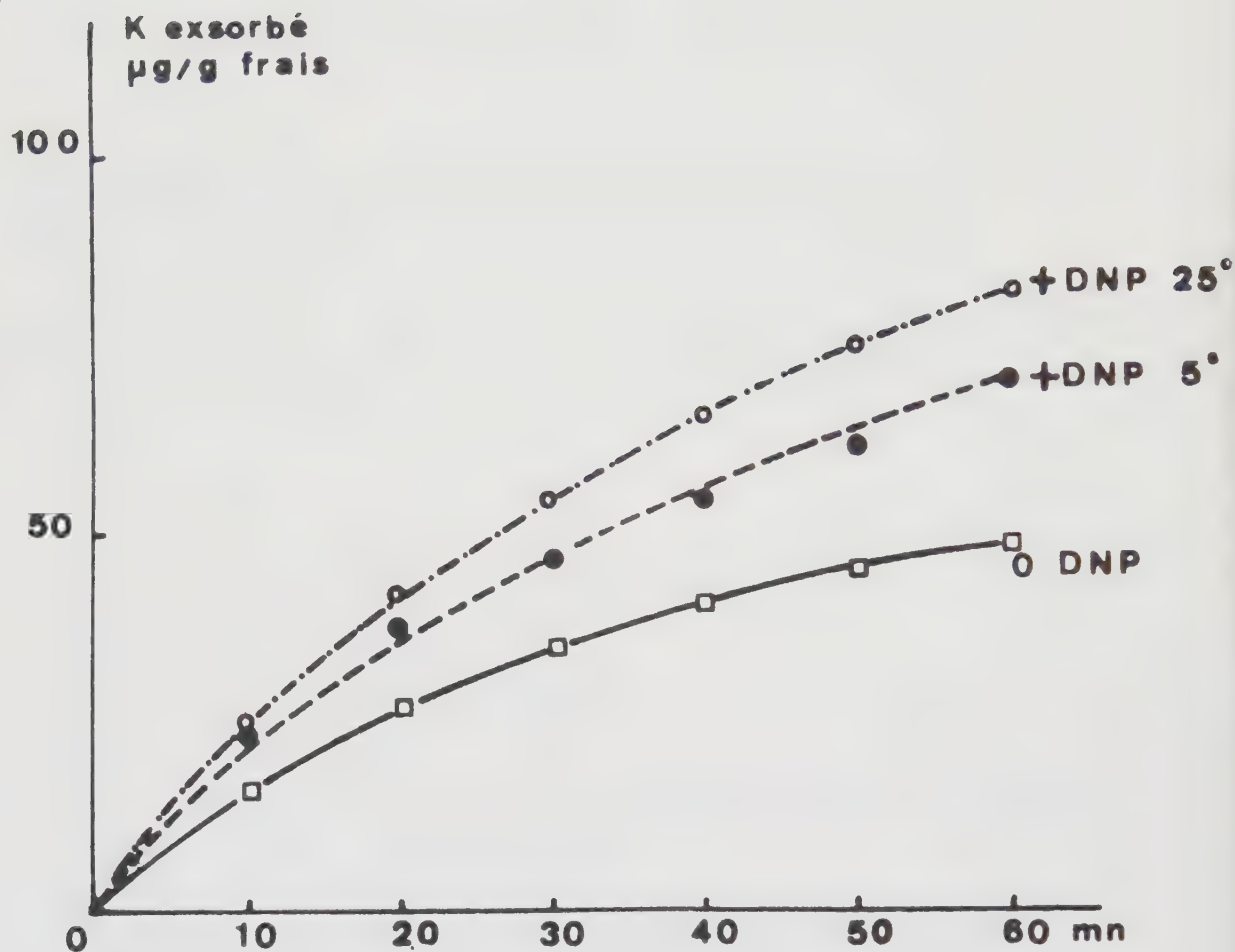


Fig.11. Influence du DNP sur l'exsorption
du potassium par les tissus de Carotte.

Tableau IV

Permanence de l'influence du 2,4-dinitrophénol sur l'exsorption du phosphore marqué par les tissus de Carotte en milieu renouvelé. (Résultats en μg de phosphore par gramme de matière fraîche).

Suppression du DNP ↓	Moments du renouvellement en mn	sans DNP	Avec DNP (1mM)
	10	0,9	2,4
	10	0,7	1,8
	20	0,6	0,7
	30	0,4	0,5
	40	0,2	0,2
	50	0,2	0,1
	60	0,1	0,1

C. Conclusion

1°) Nous avons vérifié que le cyanure de potassium inhibe fortement l'absorption, action déjà signalée par de nombreux auteurs: MACHLIS (1944), MILTHORP et ROBERTSON (1948), SUTCLIFFE (1951), LUNDEGÅRDH (1958), VALLEE (1963). On sait d'autre part que ce toxique inhibe la cytochrome-oxydase. L'absorption minérale est un phénomène nécessitant de l'énergie respiratoire. Il est possible que le cyanure de potassium supprime cette source d'énergie.

Le 2,4-dinitrophénol inhibe également l'absorption, phénomène maintes fois constaté: STENLID (1949), ROBERTSON, WILKINS et WEEKS (1951, VALLEE (1963). L'inhibition des phosphorylations oxydatives par le DNP (LOOMIS et LIPMAN, 1948) a conduit plusieurs chercheurs (ORDIN et JACOBSON, 1955; SUTCLIFFE et HACKETT, 1957) à postuler l'intervention d'intermédiaires phosphorylés riches en énergie dans l'absorption.

2°) Le cyanure de potassium ne modifie pas ou peu l'exsorption. Par contre, nos expériences - en accord avec celles de GABET (1960) et VALLEE (1963) - montrent une stimulation de l'exsorption par le DNP et cette stimulation croît avec la température.

BUTLER (1953 b) en déterminant l'espace libre apparent des racines de Blé avec le DNP trouva une valeur de 34 % au lieu de 24 % par les autres méthodes. PETTERSON (1961) obtint en présence de DNP une absorption plus rapide du sulfate pendant la première minute qu'il attribua non

pas à un agrandissement de l'espace libre, mais à une augmentation de la perméabilité de la membrane. MENGEL (1962) observa sur des racines de Tournesol intactes une augmentation significative du ^{45}Ca échangeable par traitement au DNP. Les racines traitées pendant seize heures avec une solution de DNP à 10^{-5}M montrent également une forte diminution de turgescence par rapport aux plantes témoins. Ces faits parlent en faveur d'une influence du DNP sur la perméabilité cellulaire.

Chapitre IV. - CALCUL DE L'ESPACE LIBRE

D'après le postulat qu'implique la notion d'espace libre apparent, la concentration du phosphore dans l'espace libre est la même que dans le milieu externe. Nous pouvons donc obtenir une estimation du volume de cet espace libre en divisant la masse de phosphore qu'il contient par sa concentration dans le milieu. Le problème est donc d'estimer la masse de phosphore présente dans l'espace libre. Nous l'avons tenté ici par trois méthodes :

- par extrapolation à partir d'une courbe d'absorption ;
- par suppression de l'absorption métabolique à l'aide des basses températures ou du DNP ;
- par diffusion dans de l'eau distillée.

Nous avons vu dans le premier chapitre (figure 1) que le déroulement de l'absorption dans le temps se fait en deux étapes : après le transfert des tissus dans la solution d'expérience, a lieu une rapide absorption initiale, suivie d'une accumulation linéaire dépendant du métabolisme.

L'extrapolation au temps zéro de la seconde partie de la courbe (voir schéma) donne une mesure du décalage provoqué par l'absorption indépendante du métabolisme, donc une évaluation de l'espace libre apparent. Cette méthode permet d'évaluer à $5,5 \mu\text{g}$ par gramme de matière fraîche la quantité de phosphore absorbée passivement ce qui donne pour l'espace libre une valeur d'environ 20 % en volume.

Aux basses températures, le métabolisme est très réduit et l'on peut supposer que les ions absorbés dans ces conditions le sont passivement dans l'espace libre. Cette méthode permet d'évaluer à $5,5 \mu\text{g}$ par gramme de tissus frais la quantité de phosphore absorbée passivement (voir schéma) ce qui donne pour le calcul de l'espace libre une valeur d'environ 20 %.

Le 2,4-dinitrophénol inhibe la seconde phase de l'absorption ; le phosphore absorbé en présence de DNP l'est donc passivement. Cette méthode permet d'estimer à $7 \mu\text{g}$ par gramme de matière fraîche la quantité de phosphore absorbée passivement ce qui donne pour l'espace libre une valeur d'environ 25 % en volume.

Quand on met un tissu dans de l'eau distillée à 5° , après lui avoir fait absorber une solution de concentration connue, les ions et les molécules qui avaient pénétré dans l'espace libre diffusent en sens inverse. De la quantité qui diffuse et de la concentration de la solution primitive (figure 6) nous pouvons déduire une valeur de l'espace libre d'environ 18 %.

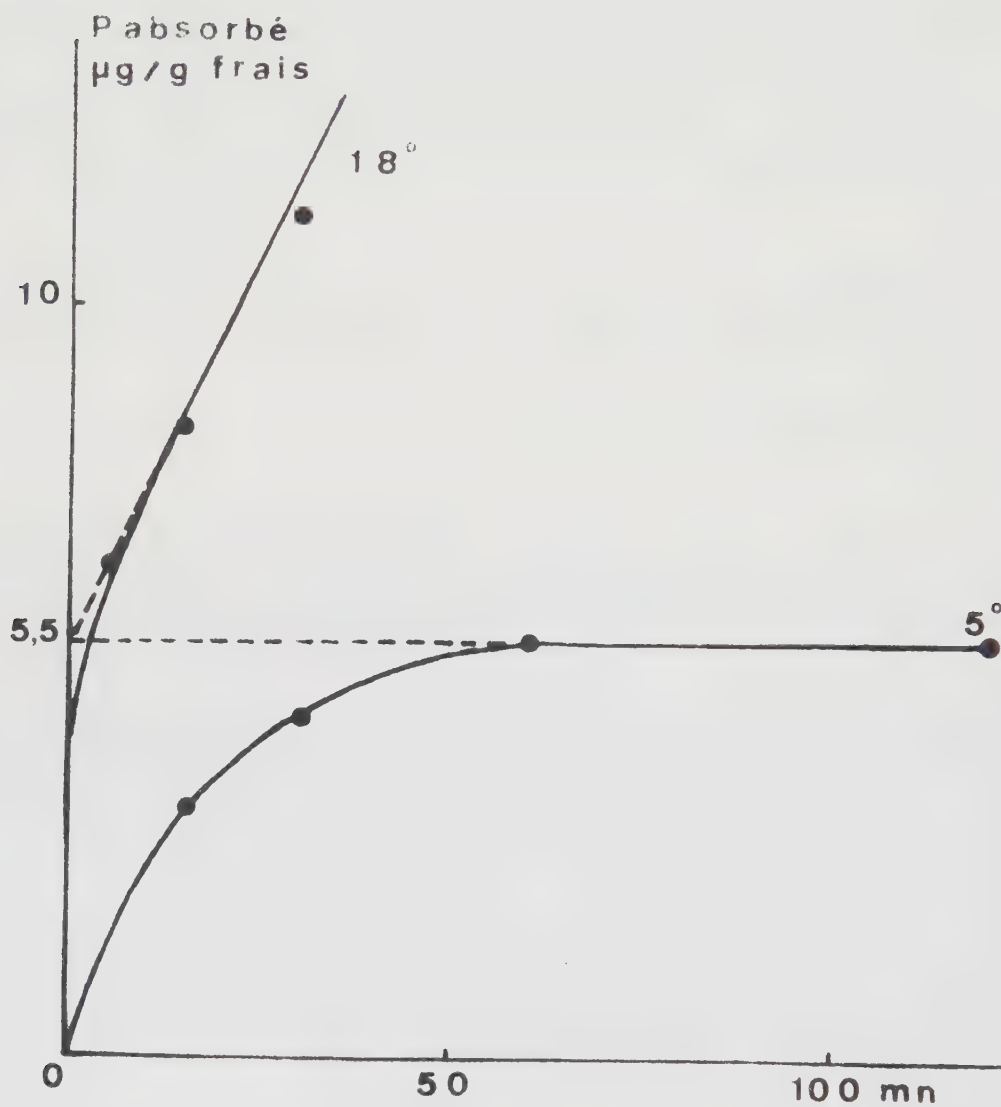


Schéma: Calcul de l'espace libre.

Toutes ces méthodes ont leur inconvénient et les résultats qu'elles donnent sont entachés d'erreur.

En premier lieu, elles supposent que la concentration de la quantité qui a pénétré dans l'espace libre est identique à celle de la solution extérieure, ce qui n'est pas forcément vrai.

Une autre source d'erreur réside dans le fait que l'on peut difficilement enlever totalement le film liquide adhérent aux couches superficielles du tissu après l'absorption. LEVITT (1957) a particulièrement souligné ce fait et il corrigea les valeurs d'espace libre trouvées par BUTLER (1953b) pour les racines de Blé en les ramenant de 29 % à 8 %. INGELSTEN et HYLMÖ (1961) remplacèrent l'essuyage des racines par la centrifugation et trouvèrent avec des vitesses de rotation croissantes (jusqu'à 1400 g) une diminution de l'espace libre de 20 à 11 %. Ces résultats furent confirmés par les expériences de BERNSTEIN et NIEMAN (1960) qui ajoutent de l'encre de chine - dont le colloïde ne pénètre pas dans l'espace libre - dans le milieu d'absorption. La quantité d'encre encore adhérente après essuyage de la racine sert pour estimer le film de surface et la valeur corrigée de l'espace libre. Ici nous avons comparé deux méthodes, l'essuyage sur papier filtre et le lavage à l'eau distillée qui ont donné des résultats sensiblement équivalents.

L'inconvénient de la détermination de l'espace libre au moyen des basses températures réside dans le fait qu'au voisinage de 0° une appréciable accumulation des ions est encore possible. LATIES (1959) put ainsi montrer qu'à une température d'expérience de 0°, une fixation de chlorure peut avoir lieu sur des sites spécifiques, dépendants du métabolisme qui se sont formés dans les tissus précédemment maintenus à une température normale. MENGEL (1961) démontra sur de jeunes racines d'Orge excisées, qu'après une absorption de trois minutes à 1°, environ 16 % de la quantité totale de potassium absorbée n'est plus ni échangeable, ni lessivable.

En supprimant l'absorption active par des poisons du métabolisme, on encourt le risque qu'une autre modification déterminante pour la grandeur de l'espace libre se produise. Nous avons vu précédemment l'influence du 2,4-dinitrophénol sur l'exsorption. Comme BUTLER (1953 b) nous obtenons par ce procédé une valeur plus élevée que par les autres méthodes.

Par contre, par exsorption dans l'eau distillée, nous obtenons une valeur plus faible ; mais nous avons vu que les valeurs obtenues pour l'exsorption sont des valeurs minimales.

Nous concluons donc à un espace libre d'environ 20 % pour les tissus de Carotte, valeur qui peut paraître un peu élevée. Mais il ne faut pas oublier qu'une culture de tissu représente une structure nettement moins complexe qu'une racine par exemple, ce qui pourrait expliquer un contrôle moins rigoureux des échanges.

Deuxième Partie

INFLUENCE DE L'AUXINE SUR L'ABSORPTION ET L'EXSORPTION

Nous avons d'abord étudié l'action des acides β indolyl-acétique et 2,4-dichlorophenoxyacétique sur l'absorption et sur l'exsorption du phosphore marqué par les tissus de Carotte. Nous avons ensuite envisagé cette même action de l'auxine sur des tissus où elle n'a pas d'influence sur la croissance, les tissus de Crown-gall de Scorsonère et enfin sur les racines isolées de Pois.

Chapitre V. - INFLUENCE DE L'AUXINE SUR L'ABSORPTION

A. Tissus de Carotte

Les colonies furent au préalable cultivées pendant un mois sur un milieu sans auxine. Toutes les expériences furent réalisées sur des explantats de 200 mg maintenus pendant deux heures, par lots de cinq, dans 10 ml de milieu marqué - à raison de 0,1 mCi par litre avec du ^{32}P , ^{42}K ou ^{45}Ca - et à diverses concentrations d'auxine. A la fin de cette période, chaque explantat est essuyé sur papier filtre, séché aux infra-rouges, puis soumis au compteur Geiger-Müller. En raison de la faiblesse des différences constatées, les expériences furent répétées au minimum cinq fois. Pour le calcium, les explantats furent minéralisés et la radioactivité mesurée sur la solution de minéralisation.

Résultats

1°) Pour le phosphore (figure 12), la courbe à 18° traduit une légère action dépressive aux faibles doses, une nette action stimulante aux doses physiologiques, une baisse puis une remontée aux doses toxiques. Ceci même quand on ramène les résultats au poids de matière sèche.

Les quantités absorbées à 5° sont plus faibles, le métabolisme étant très réduit aux basses températures. L'influence des doses physiologiques n'existe plus, nous retrouvons seulement l'action aux faibles et aux fortes doses.

Pour étudier sur quelle phase agit l'auxine, nous avons suivi le déroulement de l'absorption en fonction du temps en milieu sans auxine et dans un milieu renfermant 10^{-7} g/ml d'AIA : figure 13.

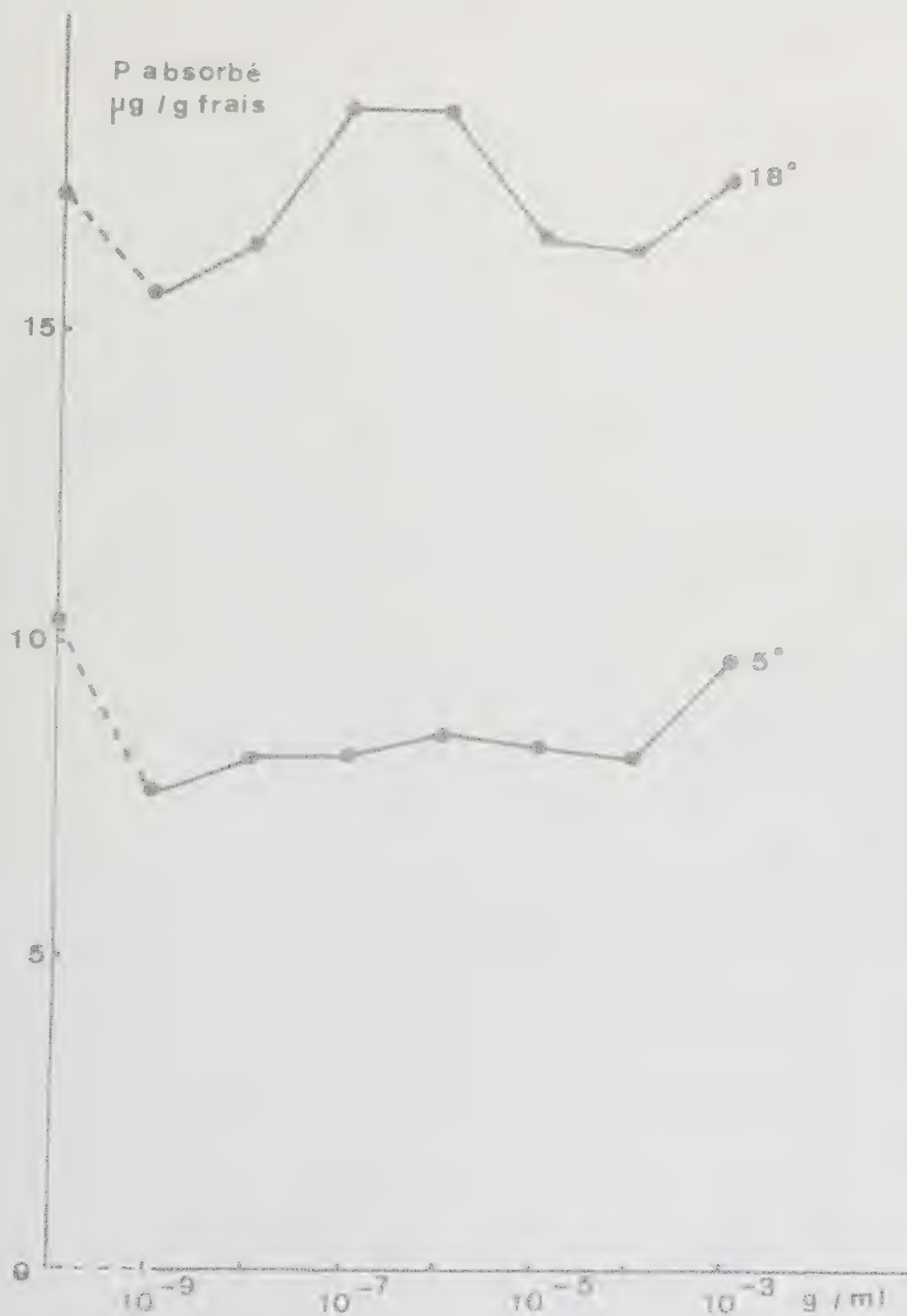


Fig.12. Influence de l'AIA sur l'absorption en 2 heures
du phosphore par les tissus de Carotte.

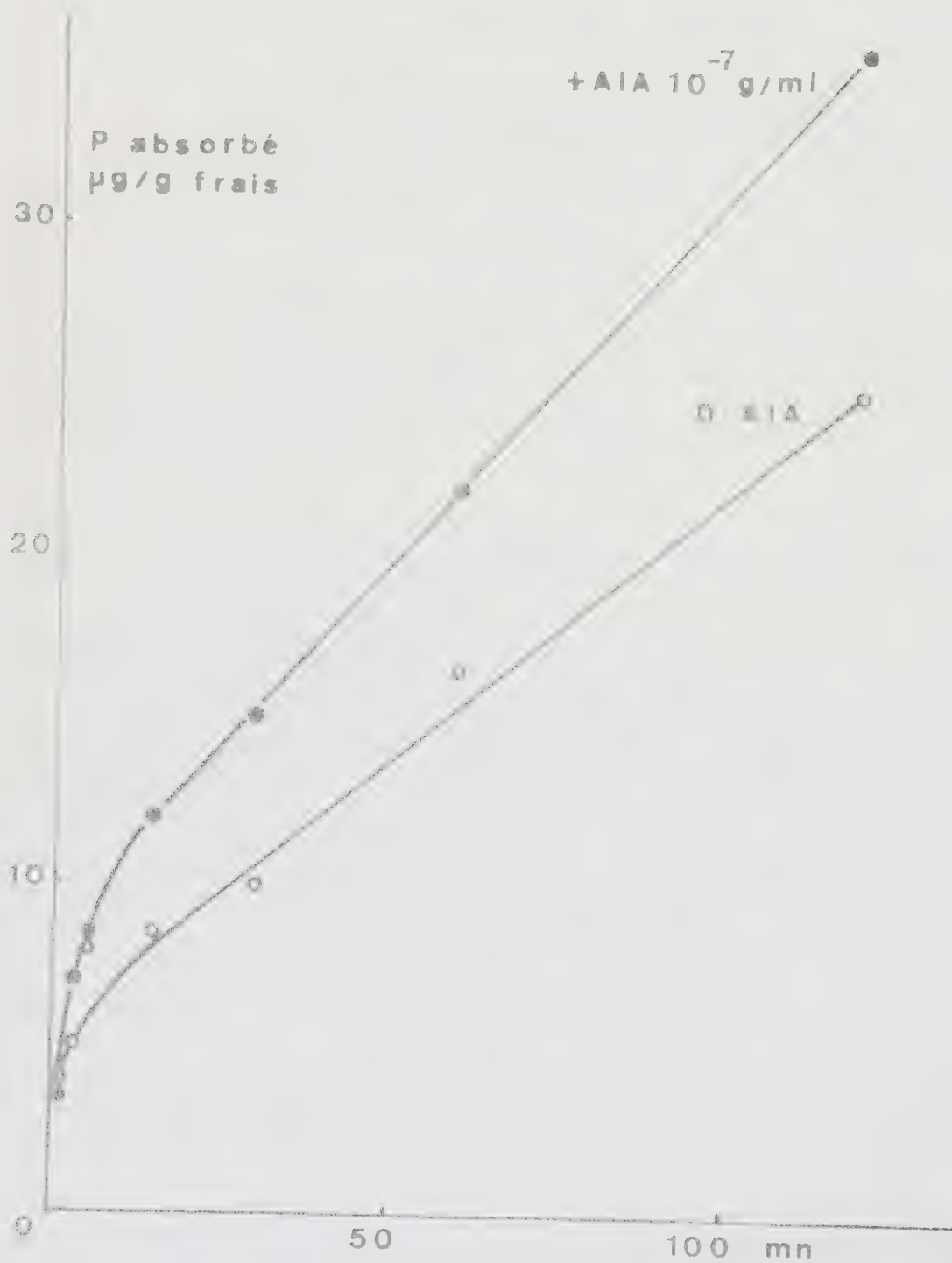


Fig.13. Influence de l'AIA sur l'absorption en 2 heures du phosphore par les tissus de Carotte à 18°

L'auxine agit sur la phase métabolique de l'absorption.

Une autre expérience fut conduite avec des tissus ayant diverses teneurs internes en auxine - résultat obtenu en les cultivant un mois et demi sur les doses correspondantes - auxquels on fait absorber du phosphore radioactif dans un milieu sans auxine : figure 14.

Nous obtenons, pour les doses étudiées, une courbe identique à celle de la figure 12. Nous pouvons donc dire que l'influence de l'auxine sur l'absorption n'est pas liée à son effet sur la croissance et la division cellulaire puisqu'elle se décèle en quelques heures. Mais c'est nécessairement une action liée au taux interne de l'auxine dans les tissus puisqu'on la retrouve par un prétraitement, l'absorption elle-même s'effectuant sans AIA dans le milieu.

Une expérience complémentaire fut entreprise avec l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique : figure 15. Ici nous n'avons plus d'action dépressive aux faibles doses, mais une action stimulante maximum pour la dose physiologique de 10^{-8} g/ml.

2°) Pour le potassium (figure 16) nous retrouvons une action analogue à celle sur l'absorption du phosphore.

3°) Pour le calcium (tableau V) au contraire l'auxine n'a pas d'influence sur son absorption.

T a b l e a u V

Influence de l'acide β indolyl-acétique sur l'absorption du calcium marqué par les tissus de Carotte à 18°

[résultats en μ g de calcium par gramme de matière fraîche (Ca/m.f.) ou sèche (Ca/m.s.)]

Concentration en auxine en g/ml	Ca/m.f.	Ca/m.s.
0	45 $\pm$ 3,9	736
10^{-9}	48 $\pm$ 3,3	864
10^{-8}	46,5 $\pm$ 2,9	765
10^{-7}	49 $\pm$ 3,9	632
10^{-6}	42 $\pm$ 3,6	843
10^{-5}	46 $\pm$ 4,2	659

Le signe $\pm$ donne les limites de l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 0,95.

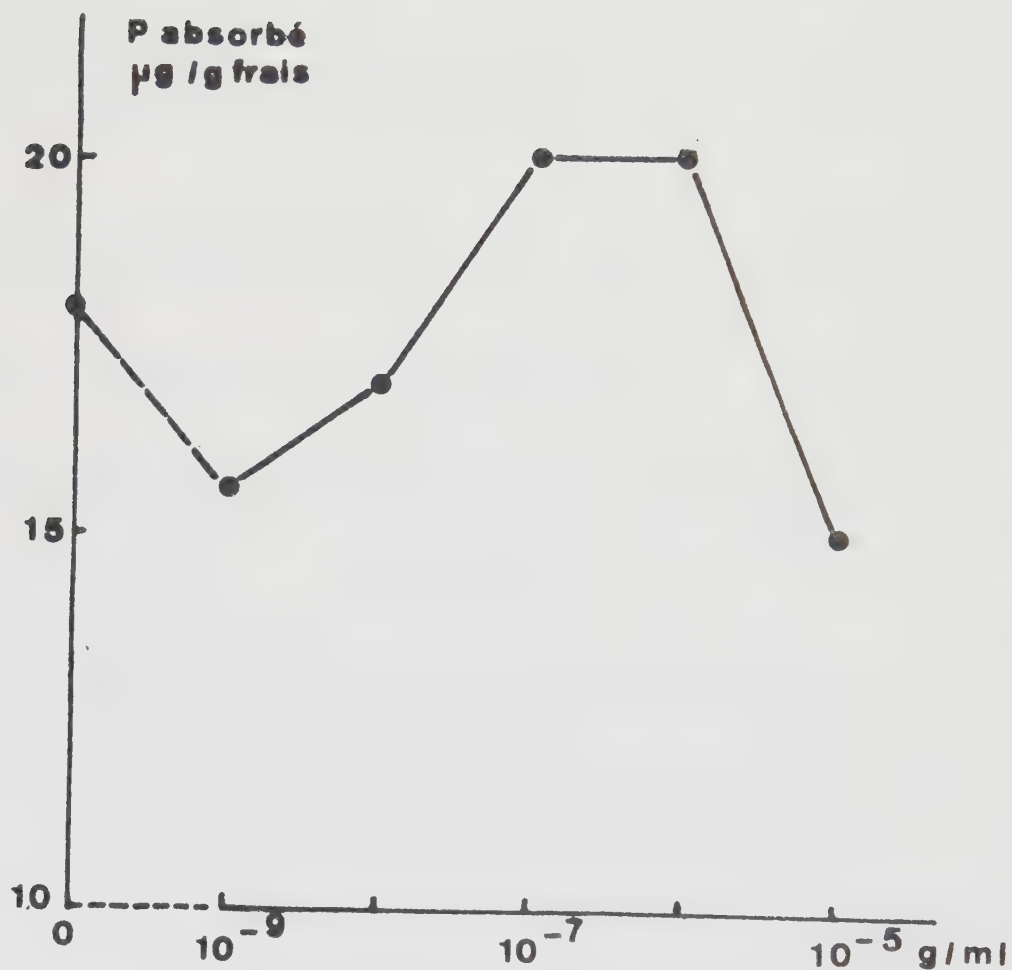


Fig. 14. Influence de diverses teneurs internes en AIA sur l'absorption en 2 heures du phosphore par les tissus de Carotte à 18°

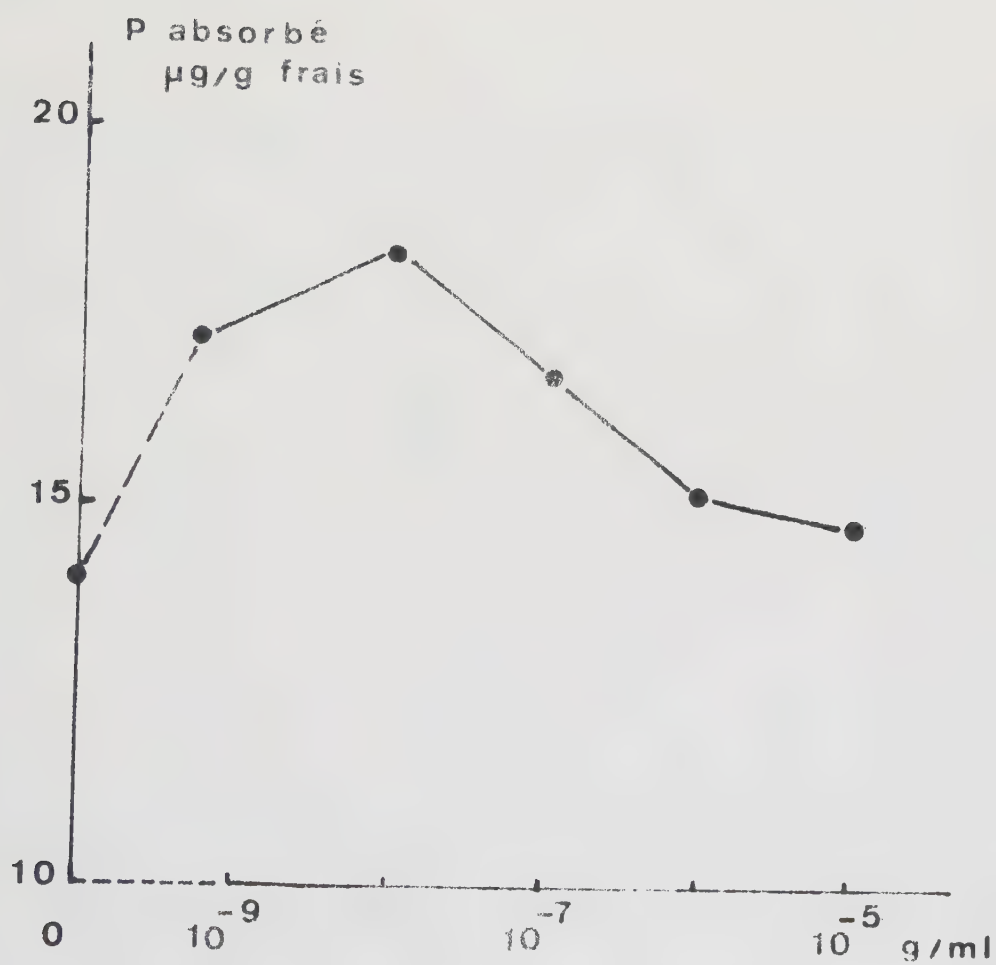


Fig .15. Influence du 2,4-D sur l'absorption en 2 heures du phosphore par les tissus de Carotte à 18°.

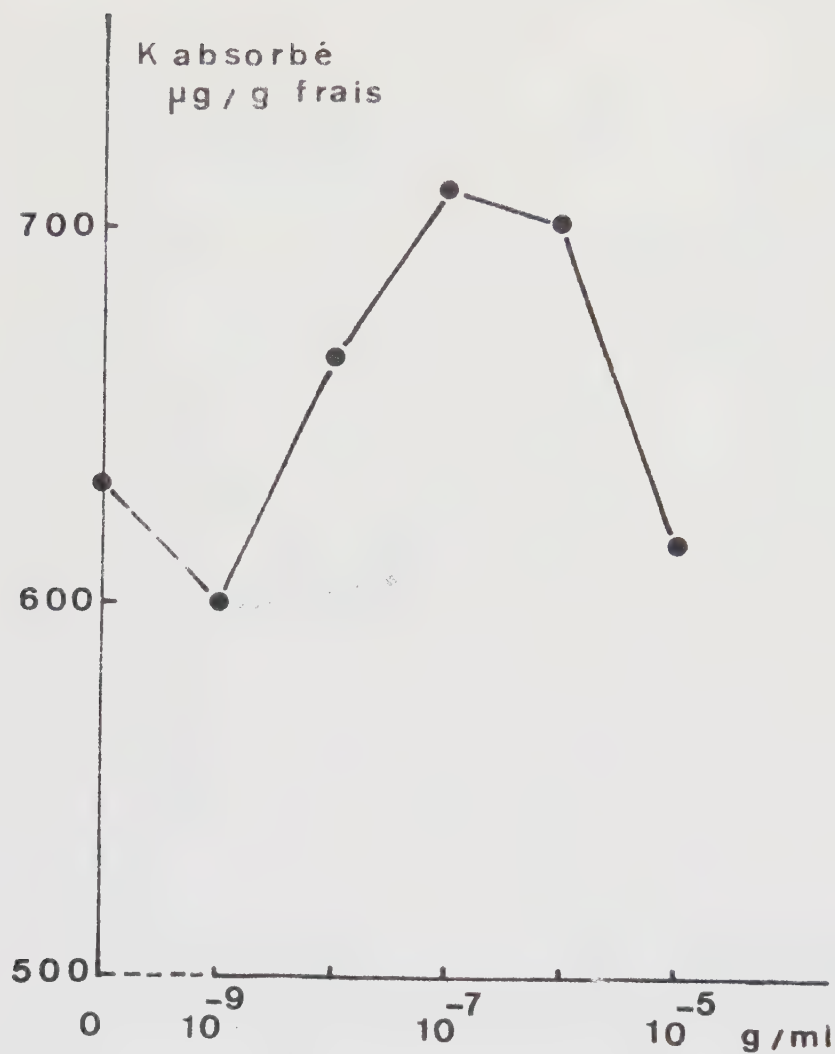


Fig.16. Influence de l'AIA sur l'absorption en 2 heures du potassium par les tissus de Carotte à 18°.

B. Tissus de Crown-gall de Scorsonère

Il était intéressant d'étudier l'action de l'auxine sur les échanges ioniques de ces tissus pour lesquels elle n'a pas d'influence sur la croissance (hormis aux doses toxiques).

Le schéma expérimental est le même que pour les tissus de Carotte.

Résultats (tableau VI).

Tableau VI

Influence de l'acide β indolyl-acétique sur l'absorption du phosphore marqué et du calcium marqué par les tissus de Crown-gall de Scorsonère à 18°

Concentration en auxine (g/ml)	matière fraîche (μ g/g)		matière sèche (μ g/g)	
	P	Ca	P	Ca
0	16 $\pm$ 1,2	41 $\pm$ 3,9	133	510
10 ⁻⁹	16 $\pm$ 1,3	38 $\pm$ 4,6	156	470
10 ⁻⁸	15 $\pm$ 1,7	42 $\pm$ 3,6	184	521
10 ⁻⁷	15 $\pm$ 1,4	40 $\pm$ 4,2	147	459
10 ⁻⁶	14 $\pm$ 1,1	40 $\pm$ 3,3	112	510
10 ⁻⁵	15 $\pm$ 0,9	36 $\pm$ 4,1	137	402
10 ⁻⁴	14 $\pm$ 1,2	40 $\pm$ 3,6	152	481
10 ⁻³	18 $\pm$ 1,6	51 $\pm$ 4,2	153	629

Le signe $\pm$ donne les limites de l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 0,95.

Aussi bien pour le phosphore que pour le calcium, l'auxine n'a pas d'action sur l'absorption par les tissus de Crown-gall. Nous constatons seulement une légère accumulation pour la dose très toxique de 1mg/ml.

C. Racines isolées de Pois

Les racines isolées cultivées pendant quinze jours en milieu complet, sont lavées dans une solution de STREET neuve puis placées pendant cinq heures dans les milieux radioactifs à l'obscurité et à 27°. A chaque concentration d'auxine correspondaient deux lots de racines, celles-ci étant placées par groupe de cinq dans des ballons à fond plat contenant 200 ml de milieu. A la fin de l'absorption les racines étaient lavées dans un milieu ne contenant pas l'élément étudié. La quantité absorbée était dosée en me-

surant la radioactivité de chaque racine. Les mêmes expériences furent réalisées sur des racines très jeunes prélevées quatre jours après la mise en germination.

Résultats

1°) Pour le phosphore (figure 17), la quantité absorbée diminue lorsque la concentration en auxine augmente. Cette baisse est particulièrement sensible à 10^{-9} et 10^{-8} , c'est-à-dire aux doses les moins toxiques. Si nous considérons les radicules, l'action de l'auxine n'est plus la même, les quantités absorbées ont tendance à augmenter avec les doses d'auxine : tableau VII.

Tableau VII

Influence de l'acide β indolyl-acétique sur l'absorption du phosphore marqué par de très jeunes racines (4 jours).

Concentration en auxine (g/ml)	Quantité absorbée en 2 heures
0	32
10^{-9}	36
10^{-8}	37
10^{-7}	47
10^{-6}	57
10^{-5}	54

résultats en μg de phosphore par gramme de matière sèche.

2°) Pour le potassium (tableau VIII) nous constatons ici encore que la quantité absorbée diminue lorsque la concentration en acide β indolyl-acétique augmente.

Tableau VIII

Influence de l'acide β indolyl-acétique sur l'absorption du potassium marqué par les racines isolées de Pois à 27° .

Concentration en auxine(g/ml)	K/m.f.($\mu\text{g/g}$)	K/m.s.($\mu\text{g/g}$)
0	980 $\pm$ 53	2733
10^{-9}	742 $\pm$ 41	1717
10^{-8}	600 $\pm$ 22	1680
10^{-7}	320 $\pm$ 16	1560
10^{-6}	250 $\pm$ 21	1702
10^{-5}	200 $\pm$ 16,5	1542

Le signe $\pm$ donne les limites de l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 0,95. (m.f., matière fraîche ; m.s., matière sèche).

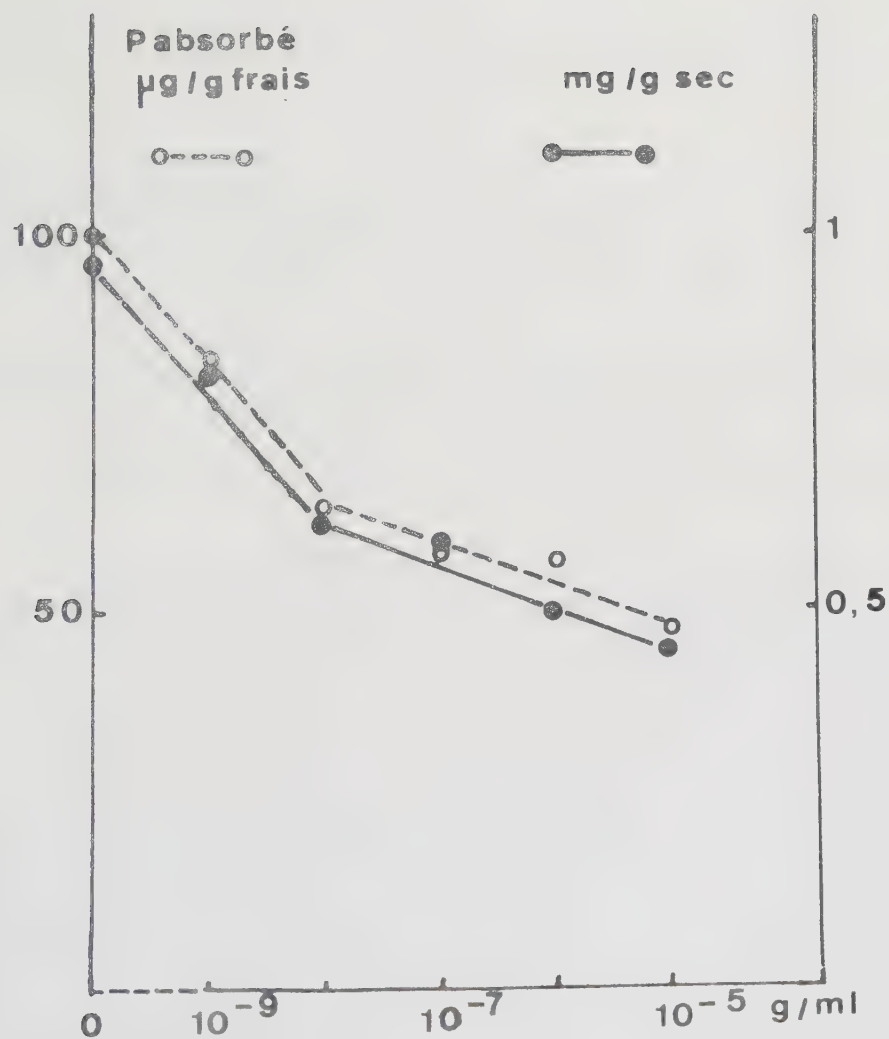


Fig.17. Influence de l'AIA sur l'absorption en 5 heures du phosphore par les racines isolées de Pois à 18° .

D. Conclusion

L'acide β indolyl-acétique stimule aux doses moyennes (10^{-7} et 10^{-6}) l'absorption du phosphore et du potassium par les cultures de tissus. Cette action disparaît aux basses températures. D'autre part, si l'on suit le déroulement dans le temps de l'absorption, l'auxine semble agir surtout sur la seconde phase de celle-ci. Ceci est confirmé par le fait que l'absorption du calcium, laquelle nous l'avons vu est passive, est insensible à l'auxine, fait déjà constaté par BRUNSTETTER et ses collaborateurs (1948).

La première idée qui vient à l'esprit pour expliquer une action de l'auxine est une modification des membranes signalée par divers auteurs (DIEHL et Coll., 1939 ; ORDIN, CLELAND et BONNER, 1955; ALBERSHEIM et BONNER, 1959), mais le fait que cette action s'exerce sur la phase active pose un problème que nous aurons l'occasion de retrouver dans la troisième partie de ce mémoire et que nous aborderons dans la discussion générale.

L'intervention de l'auxine interne est confirmée par les résultats obtenus avec les tissus tumoraux et les racines jeunes.

Chapitre VI. - INFLUENCE DE L'AUXINE SUR L'EXSORPTION

A. Tissus de Carotte

Les expériences furent réalisées sur des colonies de 200 mg que l'on met à exsorber par groupe de cinq pendant 60 mn dans 10 ml de milieu ne renfermant pas l'élément étudié, après les avoir fait absorber pendant deux heures dans 10 ml de milieu complet marqué (à raison de 0,3 mCi/l).

Résultats

1°) Pour le phosphore (figures 18 et 19), les quantités trouvées dans le milieu d'exsorption sont plus faibles à 18° en raison de la réabsorption.

Les deux courbes ne sont pas très différentes, ce qui est normal, l'exsorption en soixante minutes étant essentiellement un phénomène passif comme nous l'avons démontré précédemment.

L'auxine freine l'exsorption aux faibles doses. On observe une légère remontée aux doses physiologiques.

Une autre expérience fut conduite avec des colonies ayant diverses teneurs internes en Al²⁷ (colonies ayant poussé un mois et demi sur diverses doses d'auxine) que l'on fait exsorber en milieu sans phosphore après leur avoir fait absorber du phosphore marqué dans un milieu sans auxine (figure 20).

Nous obtenons une courbe identique aux deux précédentes.

A titre de comparaison, une expérience fut faite avec l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (figure 21).

Nous obtenons toujours le même type de courbe avec un optimum plus accentué pour la dose de 10^{-8} g/ml.

2°) Pour le potassium (figure 22), l'action est la même que sur l'exsorption du phosphore.

B. Tissus de Crown-gall de Scorsonère

Le schéma expérimental est le même que pour les tissus de Carotte.

Résultats

1°) Pour le phosphore (tableau IX), l'acide indolyl-acétique n'a pas d'influence sur l'exsorption par les tissus de Crown-gall sauf pour la dose extra-physiologique de 1 mg/ml.

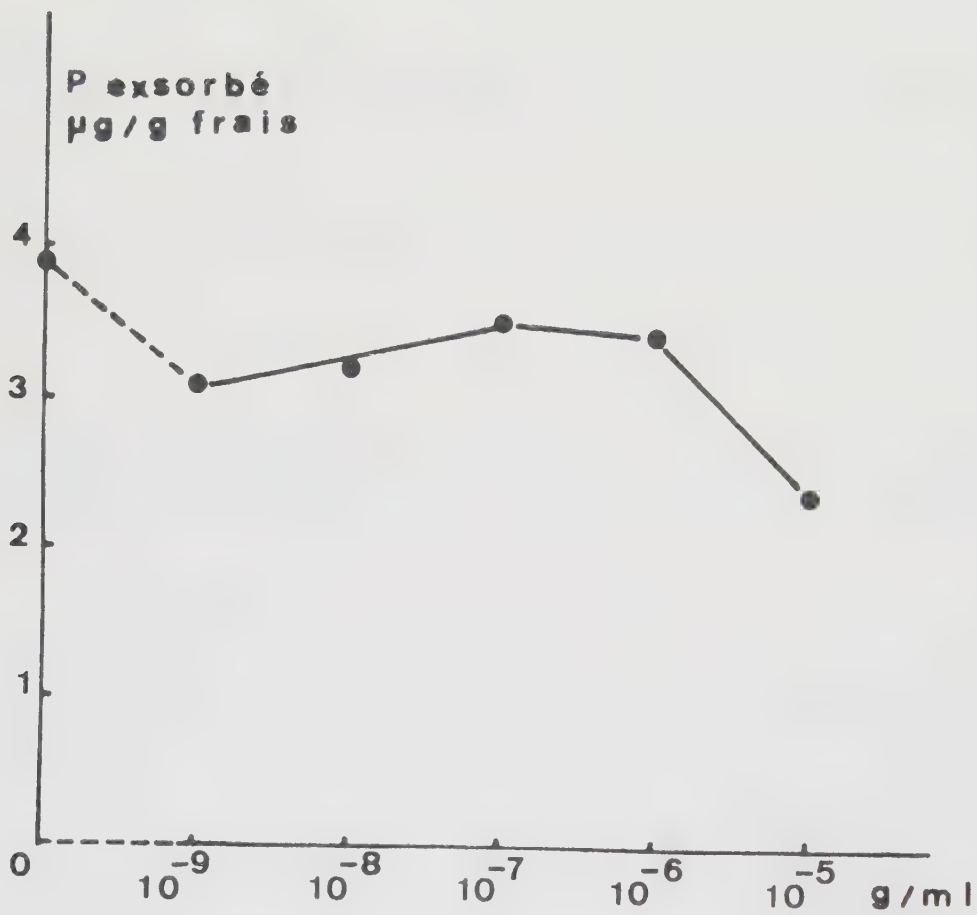


Fig. 18. Influence de l'AIA sur l'exsorption du phosphore par les tissus de Carotte à 18°.

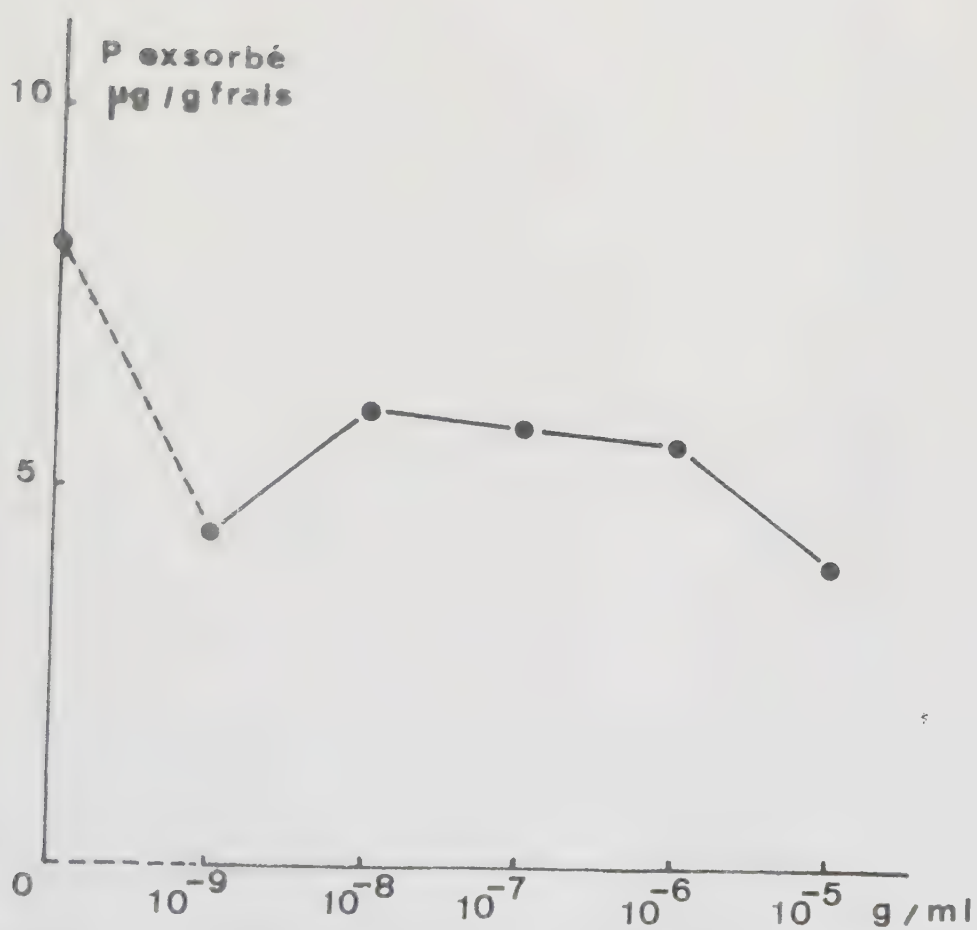


Fig.19. Influence de l'AIA sur l'exsorption du phosphore par les tissus de Carotte à 5°.

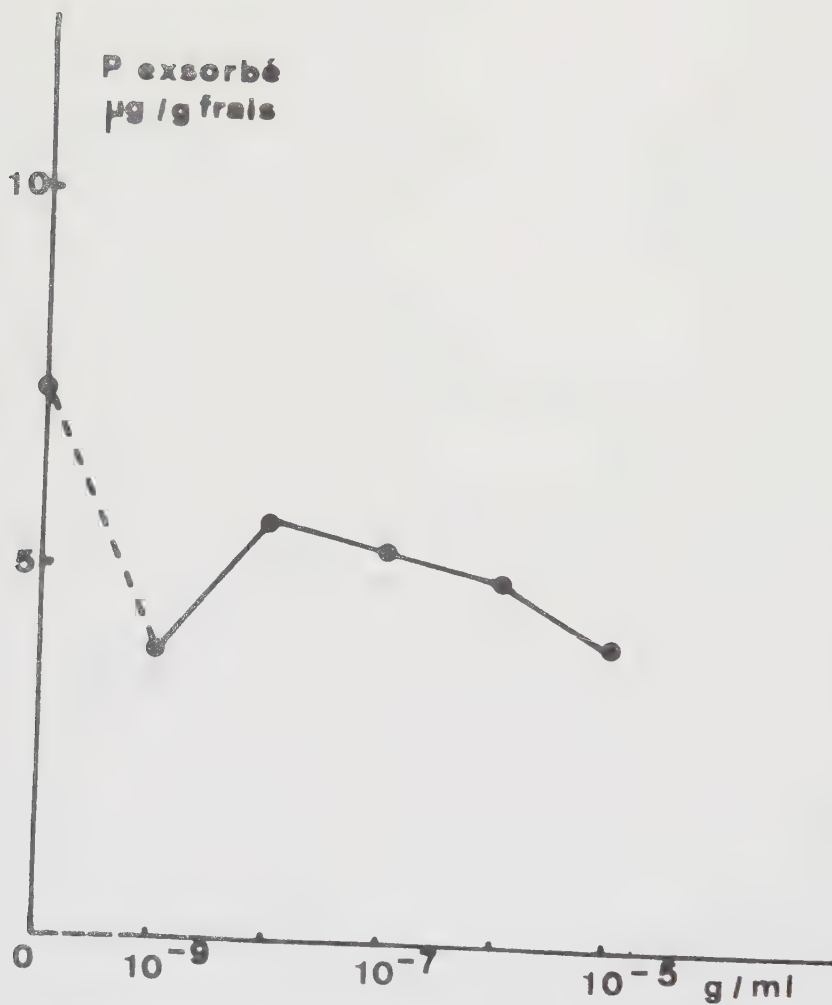


Fig.20. Influence de diverses teneurs internes en AIA sur l'exsorption du phosphore par les tissus de Carotte à 5°.

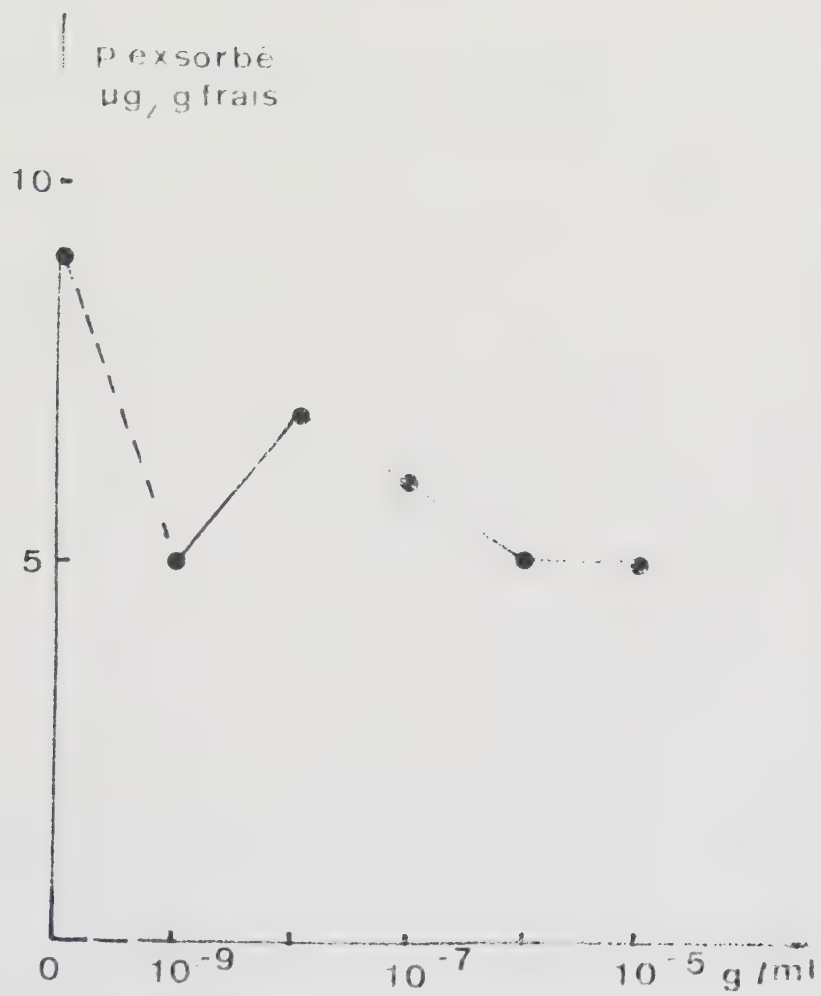


Fig. 21. Influence du 2,4-D sur l'exsorption
du phosphore par les tissus
de Carotte à 5°

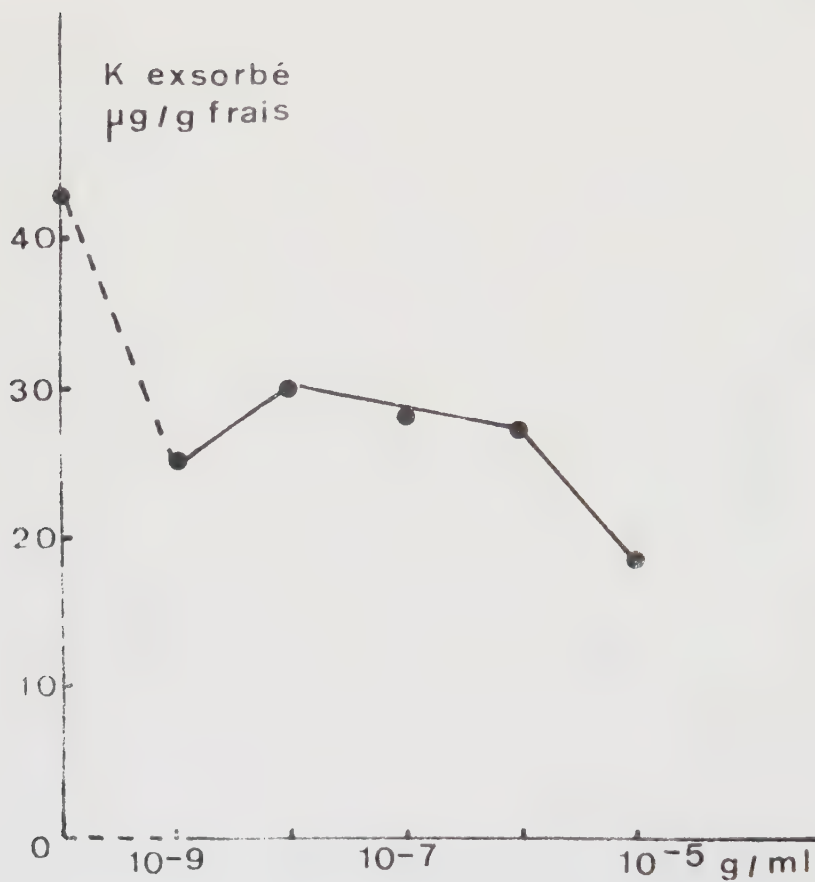


Fig 22. Influence de l'AIA sur l'exsorption du potassium par les tissus de Carotte à 18°.

2°) Pour le calcium (tableau IX), l'auxine n'a pas d'influence sur l'exsorption par les tissus de Crown-gall. Nous notons toujours une augmentation de l'exsorption pour la dose de 1 mg/ml.

Tableau IX

Influence de l'acide β indolyl-acétique sur l'exsorption du phosphore marqué et du calcium marqué par les tissus de Crown-gall de Scorsonère à 5°

Concentration en auxine (g/ml)	matière fraîche ($\mu\text{g/g}$)		matière sèche ($\mu\text{g/g}$)	
	P	Ca	P	Ca
0	3,2 $\pm$ 0,6	7,9 $\pm$ 0,9	42	118
10 ⁻⁹	3,5 $\pm$ 0,7	7,3 $\pm$ 2,6	46,4	116
10 ⁻⁸	3,8 $\pm$ 0,3	7 $\pm$ 2,3	45,3	103
10 ⁻⁷	3,8 $\pm$ 0,8	7,5 $\pm$ 3,2	53	112
10 ⁻⁶	3,4 $\pm$ 0,6	7,4 $\pm$ 1,8	50,9	109
10 ⁻⁵	3,5 $\pm$ 0,2	7,3 $\pm$ 1,9	53,2	82
10 ⁻⁴	3,5 $\pm$ 0,4	7,5 $\pm$ 2,3	53	76
10 ⁻³	4,5 $\pm$ 0,7	8,5 $\pm$ 2,4	52,6	137

Le signe $\pm$ donne les limites de l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 0,95.

C. Racines isolées de Pois

Soixante racines, après avoir passé 12 h sur un milieu nutritif complet marqué, sont soigneusement lavées, puis chaque racine est mise à exsorber dans une fiole contenant 20 ml de solution - sans l'élément étudié - placée à l'obscurité et à basse température pendant 60 mn. On mesure ensuite la radioactivité du milieu d'exsorption.

Résultats

1°) Pour le phosphore (figure 23) on constate qu'il y a une augmentation des quantités exsorbées à 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ avec un maximum à cette dernière concentration.

La même expérience fut refaite avec des racines âgées seulement de 4 jours. Nous constatons une tendance à la diminution des quantités exsorbées quand la dose d'auxine augmente (Tableau X).

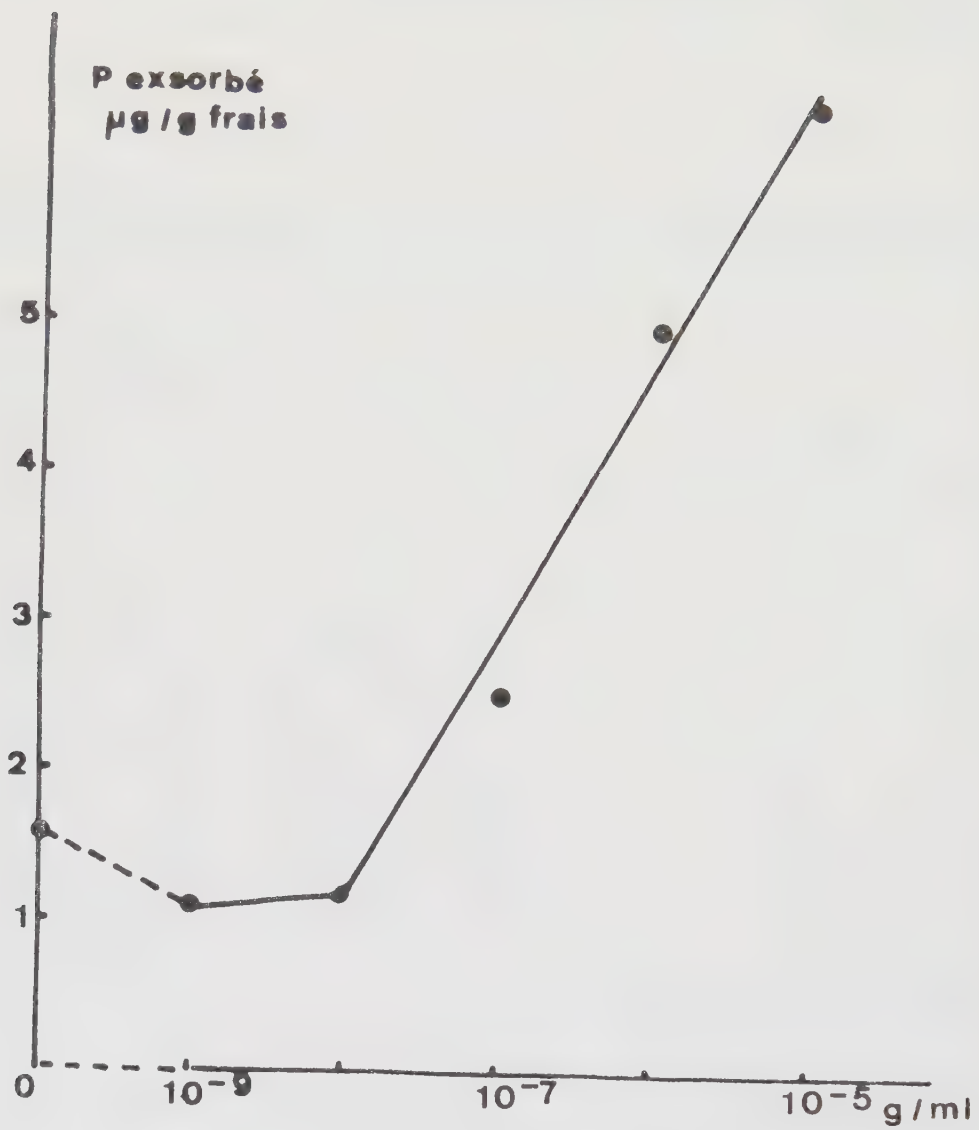


Fig.23. Influence de l'AIA sur l'exsorption du phosphore par les racines isolées de Pois à 5°.

Tableau X

Influence de l'acide β indolyl-acétique sur
l'exsorption du phosphore marqué par de
très jeunes racines

Concentration en auxine (g/ml)	Quantité exsorbée en 60 mn
0	56
10^{-9}	48
10^{-8}	36
10^{-7}	44
10^{-6}	26
10^{-5}	22

résultats en ug de phosphore par gramme
de matière fraîche.

2°) Pour le potassium (figure 24) comme pour le phosphore, les quantités exsorbées sont plus importantes quand la concentration en AIA augmente.

D. Conclusion

L'auxine aux faibles doses freine l'exsorption du phosphore et du potassium (dans un milieu sans phosphore ou sans potassium) par les tissus de Carotte ; ceci quelle que soit la température.

Pour les tissus de Crown-gall, l'auxine n'a pas plus d'influence sur l'exsorption qu'elle n'en a sur l'absorption. Seule subsiste la toxicité des doses élevées. Les quantités exsorbées sont plus faibles que pour les tissus de Carotte.

Les quantités exsorbées par les racines isolées de Pois adultes croissent avec la concentration d'AIA dans le milieu. Mais ceci n'est plus exact pour des racines très jeunes prélevées 4 jours après la mise en germination. Nous retrouvons donc ici encore l'importance de la concentration de l'auxine dans les tissus.

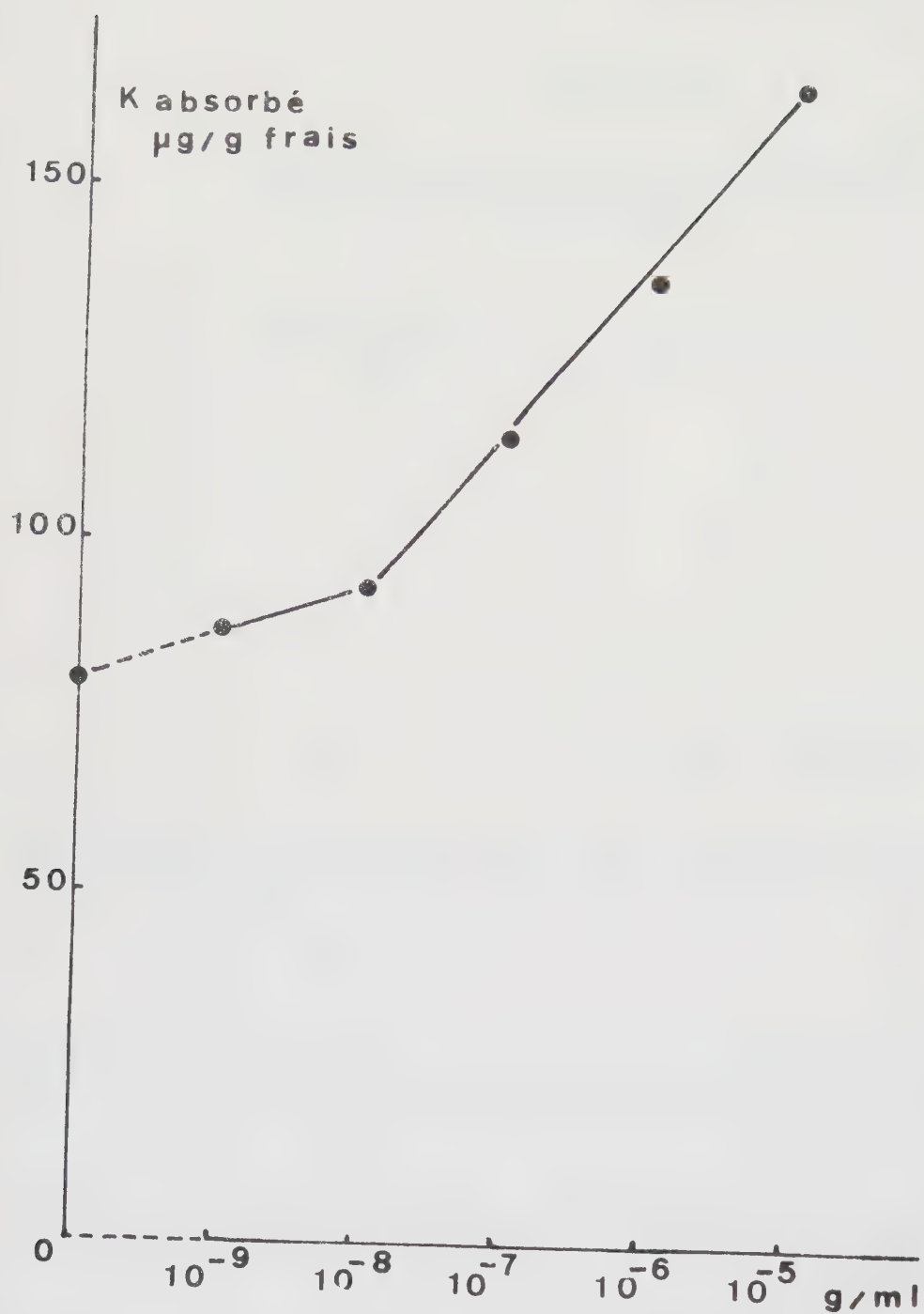


Fig. 24. Influence de l'AIA sur l'exsorption du potassium par les racines isolées de Pois à 5° .

Troisième Partie

INFLUENCE DES COLLOIDES SUR LA CROISSANCE ET L'ABSORPTION

La croissance des colonies développées sur milieu gélosé est toujours supérieure à celle obtenue sur milieu liquide. Comme nous l'avons vu dans l'historique, HELLER (1953) a pu montrer que l'action exercée par la gélose est due à la structure colloïdale engendrée au contact des tissus.

Nous avons repris ces expériences en essayant d'analyser la nature du phénomène grâce à l'étude de l'absorption et à l'emploi des bio-gels.

Chapitre VII. - INFLUENCE DES COLLOIDES SUR LA CROISSANCE

A. Expériences avec la gélose

Une expérience de contrôle fut d'abord réalisée pour vérifier l'action d'une structure colloïdale au contact des tissus sur leur croissance. Nous avons comparé la croissance des tissus de Carotte cultivés :

- à la surface d'un milieu gélosé ;
- à la surface d'une solution nutritive ;
- sur un milieu gélosé surmonté d'une mince couche de solution nutritive ;
- sur un milieu liquide surmonté d'une mince pellicule de gélose.

Les croissances furent mesurées deux mois et demi plus tard par pesées dans des sachets stériles. Les résultats sont établis sur une moyenne de 24 explantats.

Résultats : Tableau XI.

Influence de la nature du support sur la croissance des colonies tissulaires de Carotte. (La différence entre le poids frais final et le poids frais initial est donné en milligrammes).

Nature du support	Croissance
Milieu gélosé	1787
Solution nutritive	920
Milieu gélosé surmonté d'une couche de solution nutritive	847
Solution nutritive surmonté d'une pellicule de milieu gélosé	1723

En conclusion, une solution nutritive, lorsqu'elle est surmontée d'une fine pellicule de milieu gélosé, permet une aussi bonne croissance qu'un milieu gélosé homogène ; par contre un milieu gélosé, s'il est recouvert d'un mince film de solution, ne permet pas une meilleure croissance qu'une solution homogène.

Résultats

Une étude de la croissance des tissus de Carotte en fonction de la concentration de gélose dans le milieu nous a permis de retenir la dose de 8 g/l. Pour les doses inférieures le support n'est plus assez compact, pour les doses supérieures la gélose trop concentrée entraîne un durcissement du support tel que l'adhérence des explantats au milieu se trouve perturbée.

Nous avons essayé d'améliorer la croissance sur milieu liquide en doublant la concentration des éléments minéraux, mais non celle du glucose, les tissus ne le supportant pas. Les résultats sont établis sur une moyenne de 24 explantats.

Tableau XII

Comparaison de la croissance sur milieu normal et sur milieu concentré deux fois

Croissances mesurées au bout de 20 jours (en mg)

	Milieu normal	Milieu concentré deux fois
Croissance	193,3	264,2

La croissance sur milieu liquide est donc améliorée par un accroissement de la concentration des éléments minéraux. Il est probable que les conditions d'absorption interviennent, ceci sera vérifié en étudiant l'absorption du phosphore marqué.

B. Expériences avec les bio-gels

Nous avons vu que les bio-gels sont des gels sphériques constitués de grains poreux. Nous avons étudié la croissance des tissus en fonction des doses de bio-gels, de la taille des grains (différents tamis) et du diamètre des pores internes (limites d'exclusion différentes).

1°) Croissance des tissus de Carotte en présence de diverses doses de bio-gels $P_{10}^{50/100}$ et $P_{200}^{50/100}$.

Nous avons réalisé 12 tubes par dose. Ces expériences furent effectuées sur 5 ml de milieu par raison d'économie.

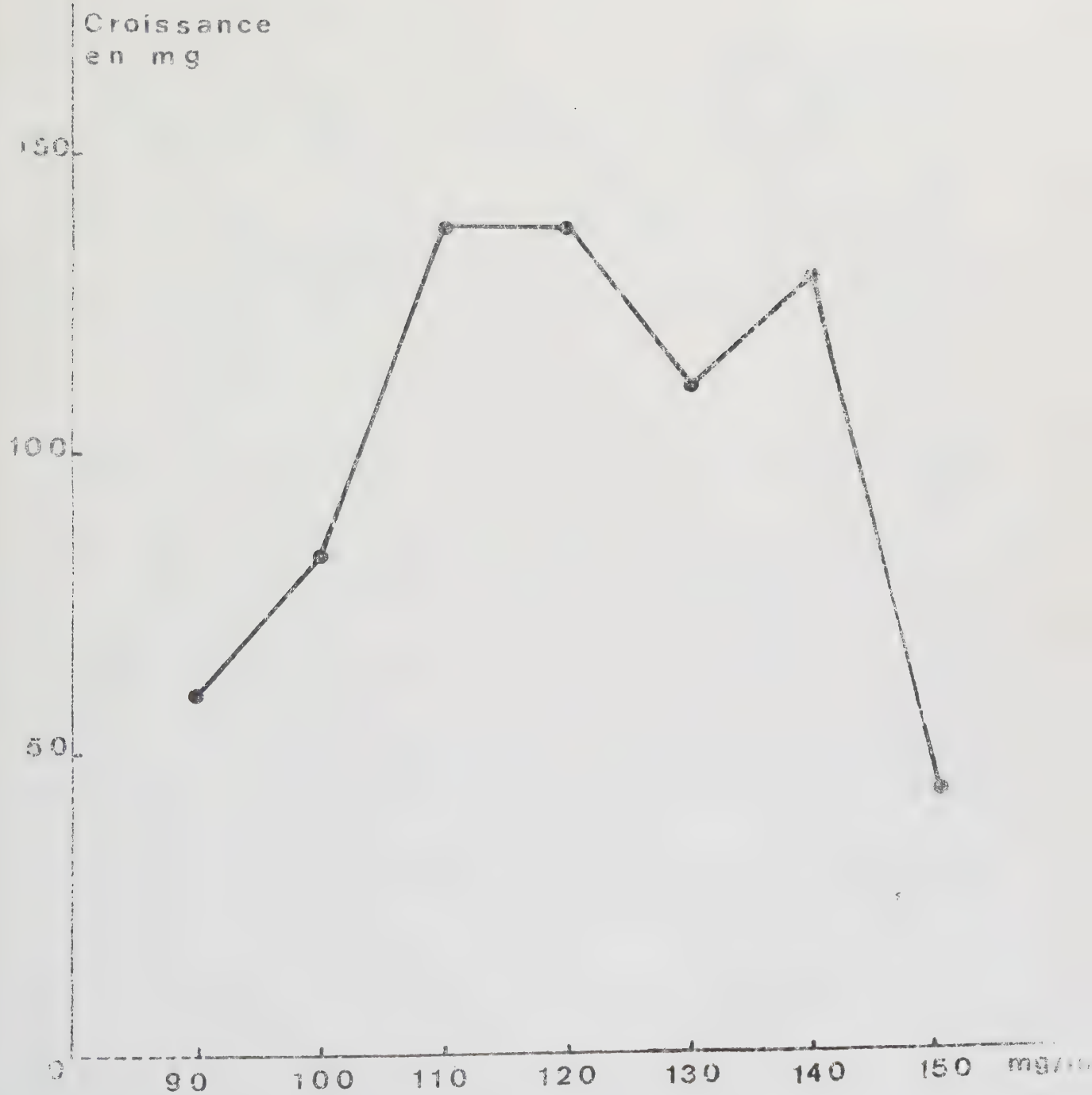


Fig.25 . Croissance des tissus de Carotte en présence
de diverses doses de P_{10} 50/100

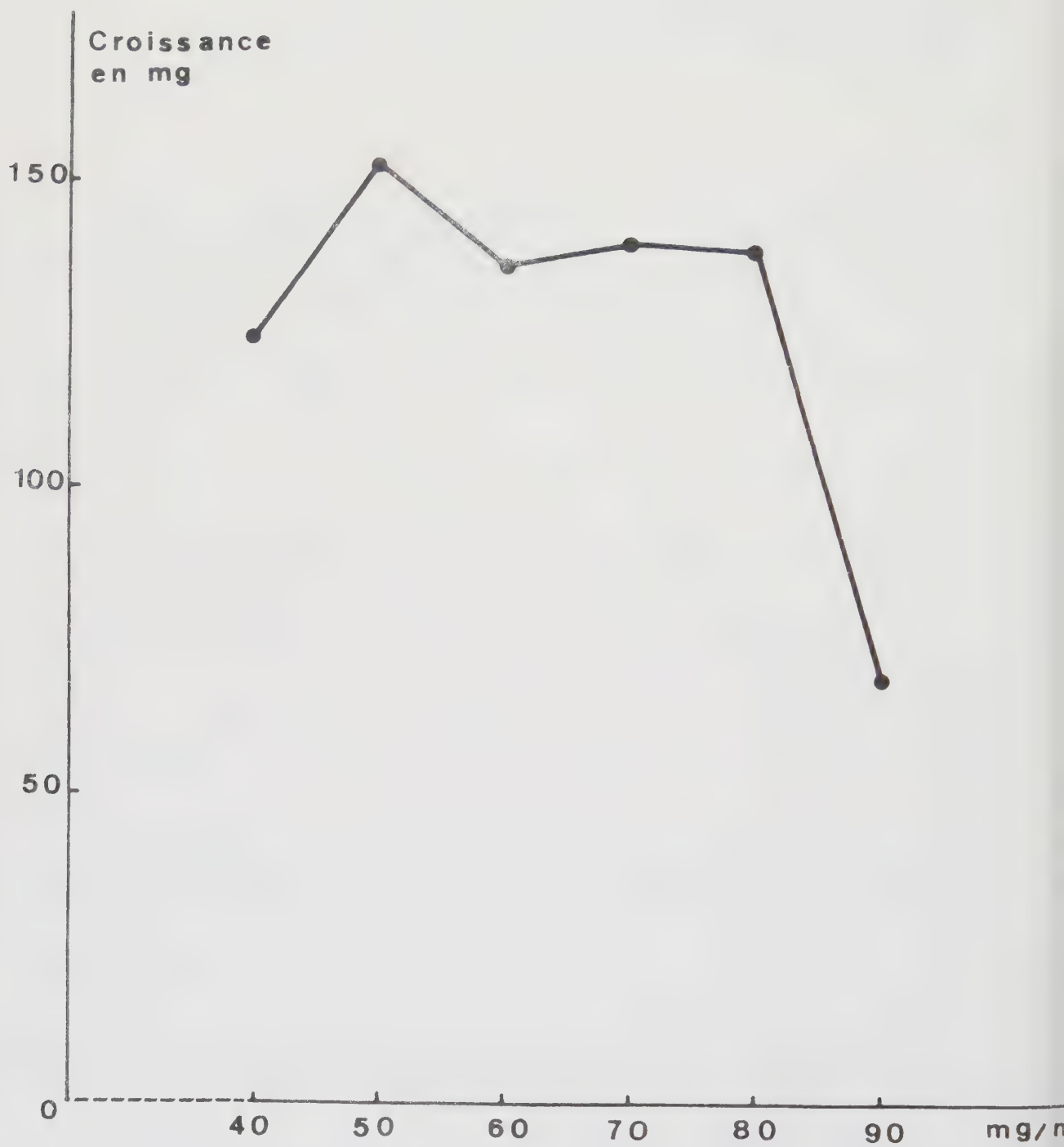


Fig.26. Croissance des tissus de Carotte en présence de diverses doses de P₂₀₀ 50/100

Résultats : figures 25 et 26.

Nous avons d'après ces résultats retenu, comme optimale, la dose de 110 mg/ml pour le P₁₀ et de 50 mg/ml pour le P₂₀₀. Ici encore sur les doses élevées les colonies ont un aspect maladif dû probablement à la déshydratation.

2°) Croissance des tissus de Carotte en présence de différents supports.

Nous avons alors comparé la croissance des tissus de Carotte sur 20 ml de milieu solidifié par de la gélose (8g/l), du bio-gel P₁₀ 50/100, P₂₀₀ 50/100 ou P₂₀₀ 100/200 (doses optimales). Les bio-gels sont autoclavés ou stérilisés à l'éther.

Résultats : Tableau XIII

Comparaison de la croissance des tissus de Carotte sur différents supports
Croissance mesurée au bout d'un mois (en mg)

	Gélose (8g/l)	P ₂₀₀ 50/100		P ₂₀₀ 100/200		P ₁₀ 50/100	
		autoclavé	éther	autoclavé	éther	autoclavé	éther
Croissance	255,4	350,4	317	314,4	370,5	301,2	257,9

La croissance sur bio-gel autoclavé est nettement supérieure à celle obtenue sur gélose. Le P₁₀ entraîne une croissance légèrement moins bonne que le P₂₀₀. La stérilisation à l'éther provoque une diminution de croissance sauf pour le P₂₀₀ 100/200.

Nous avons également mesuré les teneurs en eau des colonies sur ces différents supports. Les résultats sont consignés dans le tableau XIV.

Tableau XIV

Influence de la nature du support sur les teneurs en eau des tissus de Carotte

Teneurs en eau	Gélose	Milieu liquide	P ₁₀ 50/100	P ₂₀₀ 50/100
% MF	93,7	95,7	92	93,5
% MS	1462	2355	1163	1452

Nous voyons que si les colonies sur gélose et sur P₂₀₀ ont des teneurs en eau voisines, elles ont des teneurs nettement plus élevées sur milieu liquide et plus faibles sur P₁₀ qui retient probablement l'eau à son profit.

C. Conclusion

Nous avons pu montrer après HELLER que le milieu gélosé favorise la croissance des colonies tissulaires grâce à une action de contact. Mais nous avons en outre démontré l'amélioration de la croissance sur milieu liquide par concentration des éléments minéraux. Enfin, nous avons pu constater la nette amélioration de croissance obtenue sur un milieu solidifié par différents bio-gels. Il était intéressant de poursuivre ces recherches en étudiant non plus la croissance mais l'absorption.

Chapitre VIII. - INFLUENCE DES COLLOIDES SUR L'ABSORPTION

A. Expériences avec la gélose

1°) Pour le phosphore

Ces essais ont consisté à comparer l'absorption du phosphore marqué par des colonies développées sur milieu liquide, sur milieu gélosé, sur milieu gélosé surmonté d'une couche de solution nutritive et sur solution nutritive surmontée d'une pellicule de milieu gélosé. Aux intervalles de temps indiqués sur la courbe, on prélève 12 explantats dont on mesure la radioactivité.

Résultats : figure 27.

Le contact du milieu gélosé (à la concentration de 10 g/l) favorise nettement l'absorption du phosphore marqué par les tissus de Carotte.

Nous avons ensuite cherché à savoir sur quelle phase de l'absorption portait cette stimulation. Une nouvelle expérience fut entreprise pour comparer l'absorption sur milieu liquide et sur milieu gélosé pendant les 120 premières minutes. Quatre vingt seize colonies sont réparties sur 4 cristallisoirs contenant 200 ml de milieu gélosé ou liquide (deux cristallisoirs pour chaque milieu). Aux intervalles de temps indiqués, on prélève 6 explantats dont on mesure la radioactivité. Les résultats sont établis sur la moyenne des six valeurs.

Résultats : figures 28 et 28 bis.

Nous constatons que dans la partie correspondant à l'absorption passive (les premières minutes) la courbe est plus élevée sur milieu liquide tandis que la droite traduisant l'absorption active est abaissée. L'action du milieu gélosé sur l'absorption du phosphore porte donc sur la seconde phase de celle-ci.

Nous avons effectué un dosage de phosphore au spectrophotomètre sur 24 colonies âgées d'environ un mois, dont 12 ayant poussé sur solution nutritive et 12 sur milieu gélosé. Pour chaque lot, les colonies sont deséchées aux infra-rouges et broyées. On effectue une attaque nitro-sulfurique sur 50 mg de la poudre obtenue. A la fin de la minéralisation, la solution est neutralisée et ajustée à 10 ml. Un dosage de phosphore est effectué par la méthode de DUCET et VANDEWALLE (1959) sur des prises de 2 et 4 ml en ne gardant que la phase alcoolique contenant le phosphore minéral.

D'autre part 24 colonies (12 sur solution nutritive et 12 sur milieu gélosé) ont poussé sur des milieux marqués avec du phosphore radioactif. Les 12 explantats sont broyés très finement dans 3 ml d'acide perchlorique N pendant 20 minutes avec un peu de sable et dans un bac à glace. Puis l'on procède à la séparation des principales formes de phosphore suivant la méthode décrite précédemment. La radioactivité de chaque fraction est étudiée par 3 prélèvements de 1 ml.

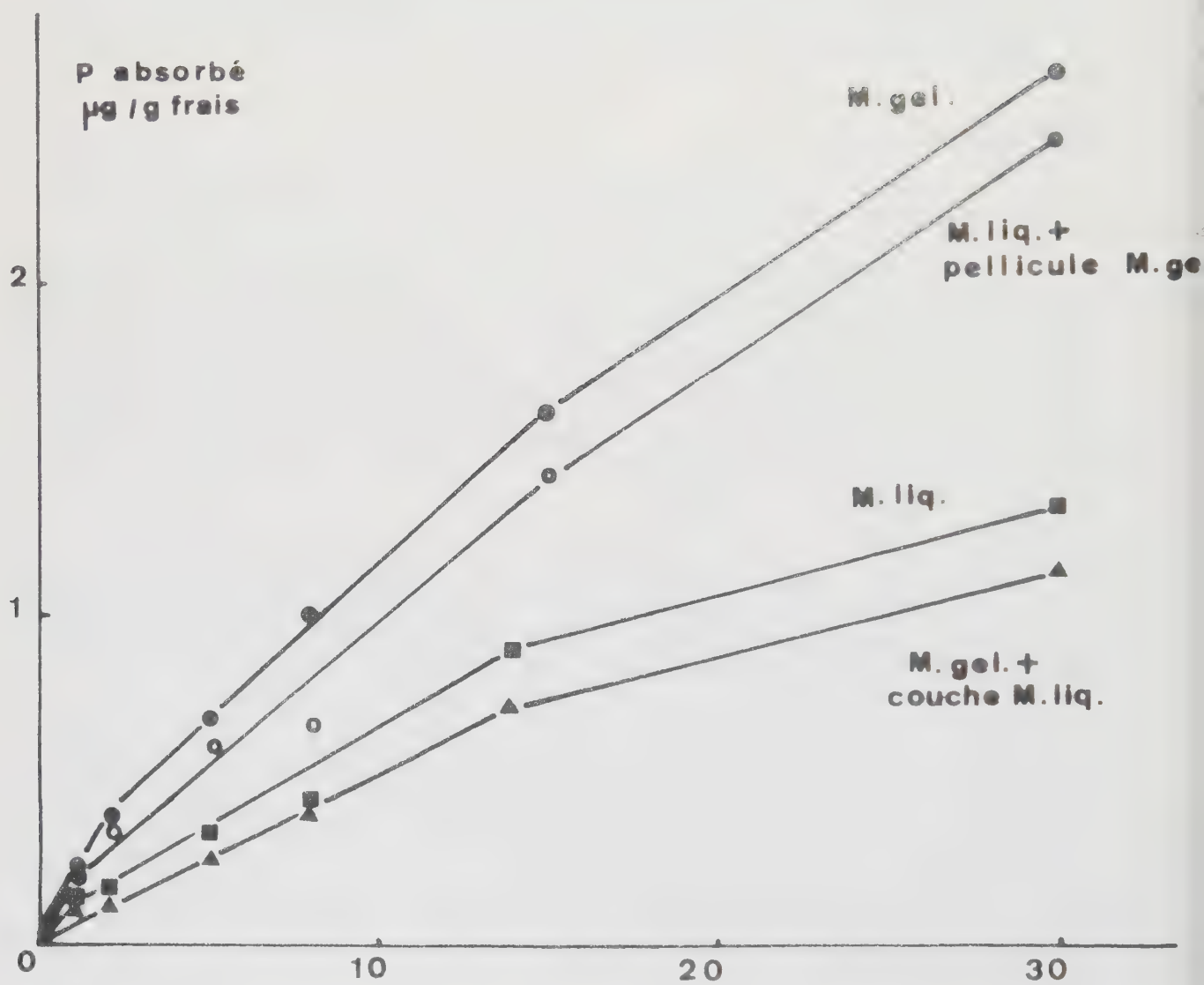


Fig .27 . Influence de la nature du substrat sur l'absorption du phosphore par les tissus de Carotte à 18°.

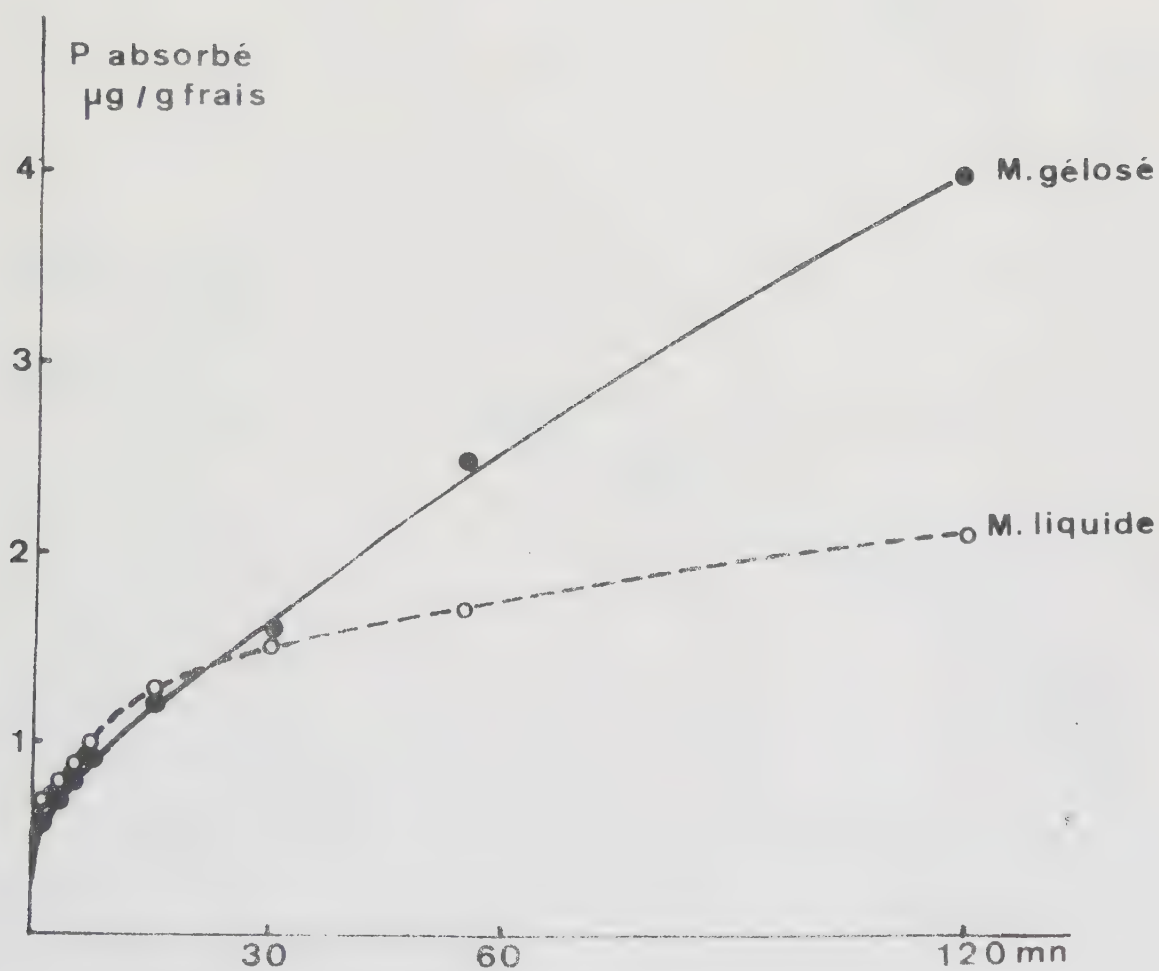


Fig. 28. Influence de la nature du substrat sur l'absorption du phosphore par les tissus de Carotte à 18°.

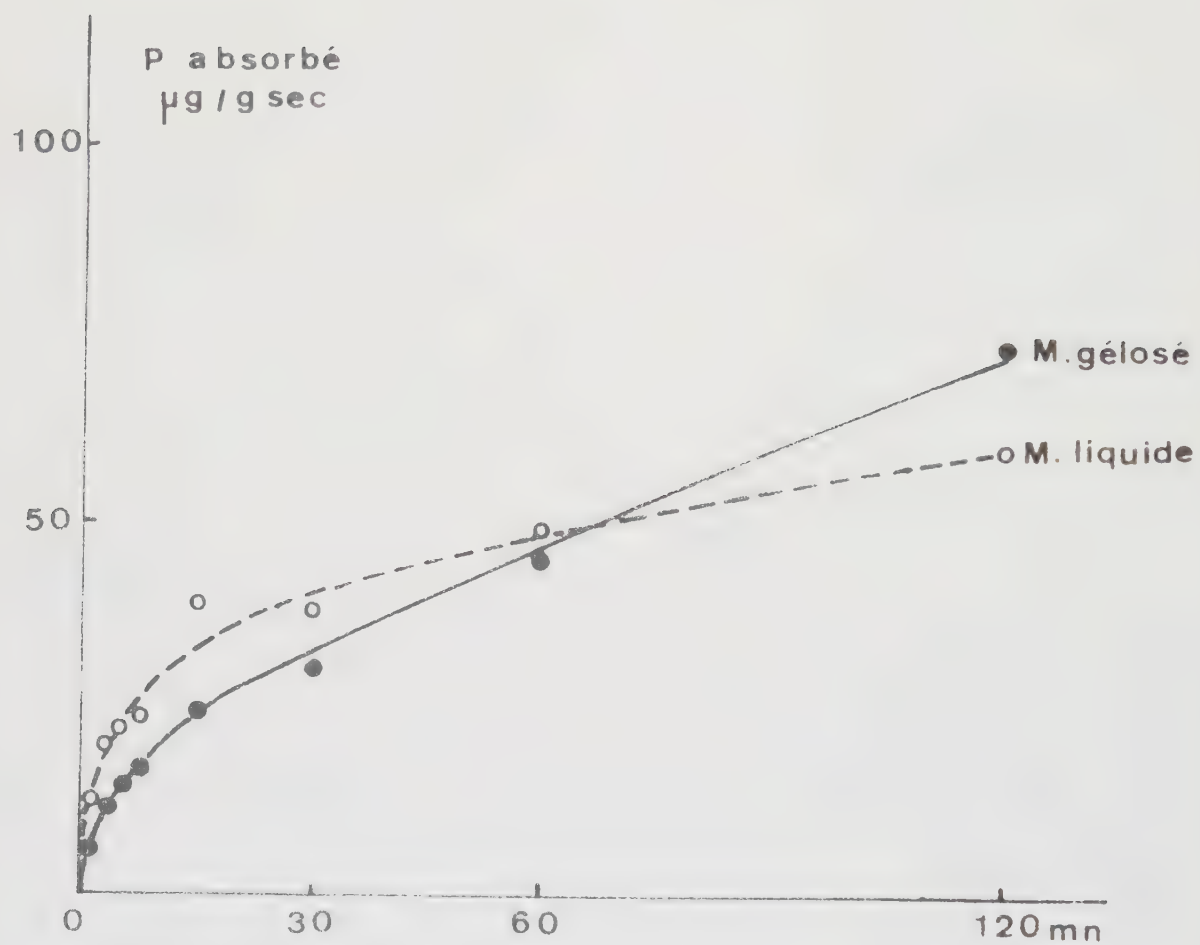


Fig 28 bis. Influence de la nature du substrat sur l'absorption du phosphore par les tissus de Carotte à 18° .

Résultats : Tableaux XV. et XVI.

Tableau XV

Influence de la nature du support sur la teneur en phosphore total des tissus de Carotte

Résultats en μg par gramme de matière fraîche ou sèche

MILIEU GELOSÉ		SOLUTION NUTRITIVE	
P/m.f.	P/m.s.	P/m.f.	P/m.s.
4500	187,8	2000	70,7

Tableau XVI

Influence de la nature du support sur la teneur en différentes formes de phosphore des tissus de Carotte

Résultats en μg de phosphore par gramme de matière fraîche

	Milieu gélosé	Solution nutritive
Phosphore minéral	21	8
Phosphore lipidique	59	22
Acides nucléiques	24	9
Phosphore organique (autres formes)	72	19

Les tissus sur milieu gélosé sont plus riches en phosphore que les tissus sur solution nutritive.

Les vitesses d'intégration dans les quatre grands groupes sont augmentées dans les mêmes proportions (environ 3) sur milieu gélosé. Cela semblerait suggérer qu'il ne s'agit pas d'un phénomène de simple absorption mais d'assimilation.

2°) Pour le soufre, le calcium et le potassium

Schéma expérimental. -

a) Pour le soufre. - Des tissus de Carotte sont mis en culture sur milieu contenant des sulfates marqués avec du soufre radioactif, la moitié sur solution nutritive, l'autre sur milieu gélosé. Aux temps indiqués 12 colonies sont prélevées et analysées (mesures de radioactivité).

b) Pour le calcium et le potassium. - Après un mois de culture sur milieu gélosé ou sur solution nutritive, 12 colonies de tissus de Carotte sont prélevées et minéralisées (minéralisation nitro-perchlorique). Le résidu sec est repris par de l'eau acidulée. Le liquide est étendu à 25 ml. Cette solution est soumise au spectrophotomètre de flamme pour dosage du potassium et du calcium. Pour le potassium, nous avons en outre étudié l'absorption dans les premières minutes avec du ^{42}K .

Résultats

a) Pour le soufre : figure 29.

Le milieu gélosé accélère l'absorption du sulfate marqué par les tissus de Carotte.

b) Pour le calcium : Tableau XVII.

Les tissus sur milieu gélosé ont des teneurs en calcium nettement plus élevées que ceux sur solution nutritive.

c) Pour le potassium : Tableau XVII.

La quantité totale absorbée par colonie est plus élevée sur milieu gélosé ; mais la croissance y étant plus rapide, la teneur par milligramme de matière sèche est finalement plus faible que sur milieu liquide. A la lumière des résultats précédents nous pouvons émettre l'hypothèse que pour le potassium la vitesse d'absorption est limitée.

Dans les premières minutes, nous retrouvons le même phénomène qu'avec le phosphore, mais ici il est beaucoup plus bref, dès la quinzième minute l'absorption est plus rapide sur milieu gélosé (figure 30).

Tableau XVII

Influence de la nature du support sur la teneur en calcium et potassium des tissus de Carotte

(résultats en μg par milligramme de matière fraîche ou sèche)

Taux dans les tissus	Milieu gélosé		Solution nutritive	
	Ca	K	Ca	K
Par mg de matière sèche	7,7	37	3,7	43
Par colonie	280	1600	87	1300
Par mg de matière fraîche	0,54	2,5	0,19	2,2

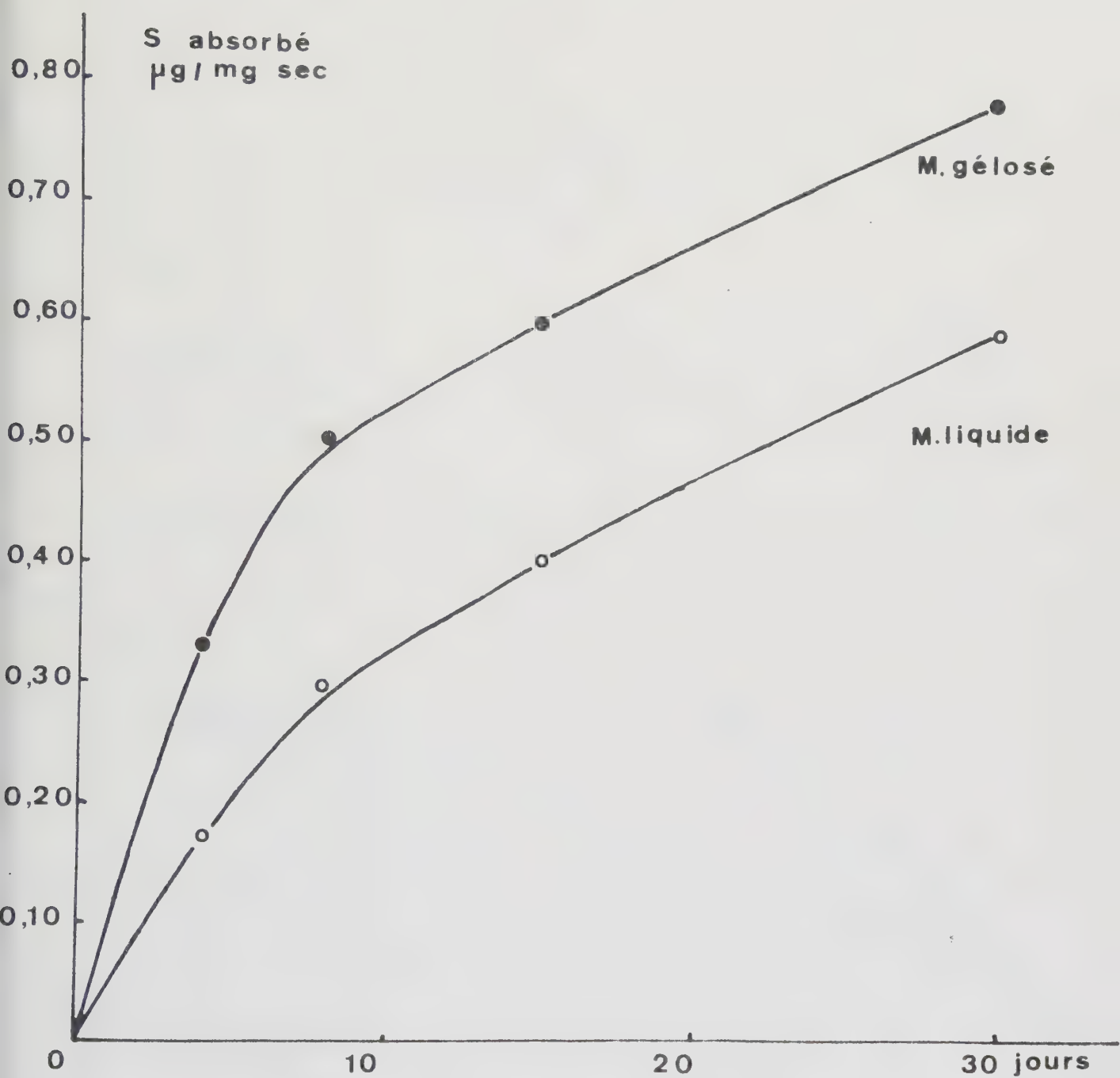


Fig.29 .Influence de la nature du substrat sur l'absorption
du soufre par les tissus de Carotte à 18° .

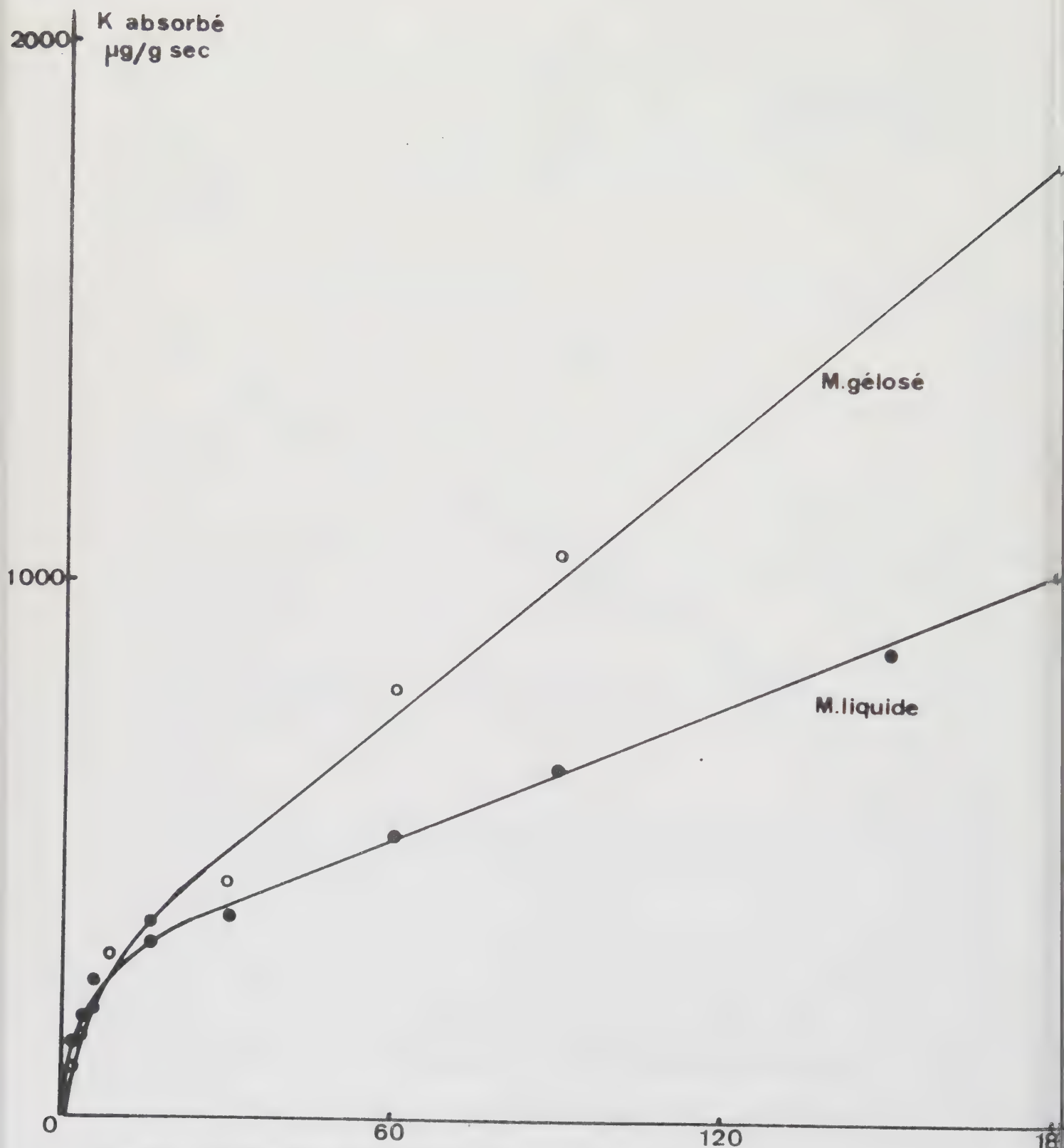


Fig.30. Influence de la nature du substrat sur l'absorption du potassium par les tissus de Carotte à 18° .

B. Expériences avec les bio-gels

Ces essais ont consisté à comparer l'absorption du phosphore marqué pendant les 180 premières minutes par des colonies développées sur les deux bio-gels que nous avons étudiés à savoir P₂₀₀ 50/100 et P₁₀ 50/100. Le protocole expérimental est le même que pour la gélose. Les bio-gels sont autoclavés ou utilisés sans préparation.

Résultats : figures 31 et 32.

Nous observons ce fait surprenant que le bio-gel (P₂₀₀ 50/100) qui permet la meilleure croissance, provoque au cours des premières minutes l'absorption la plus lente du phosphore. Avec le P₁₀ nous retrouvons le phénomène déjà observé avec le milieu liquide à savoir qu'un échange trop rapide dans les toutes premières minutes entraîne ensuite un ralentissement de l'absorption.

La courbe d'absorption, en fonction du temps, sur le bio-gel P₂₀₀ 50/100 présente des points d'inflexion qui rappellent ceux observés par GRIGNON et SALSAC (1969) avec les racines et les cellules isolées.

Si nous observons les quantités absorbées en 8 et 24 heures nous constatons qu'elles sont un peu plus faibles sur bio-gel que sur gélose.

Tableau XVIII

Influence de la nature du support sur l'absorption du phosphore
Les quantités absorbées sont données en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche

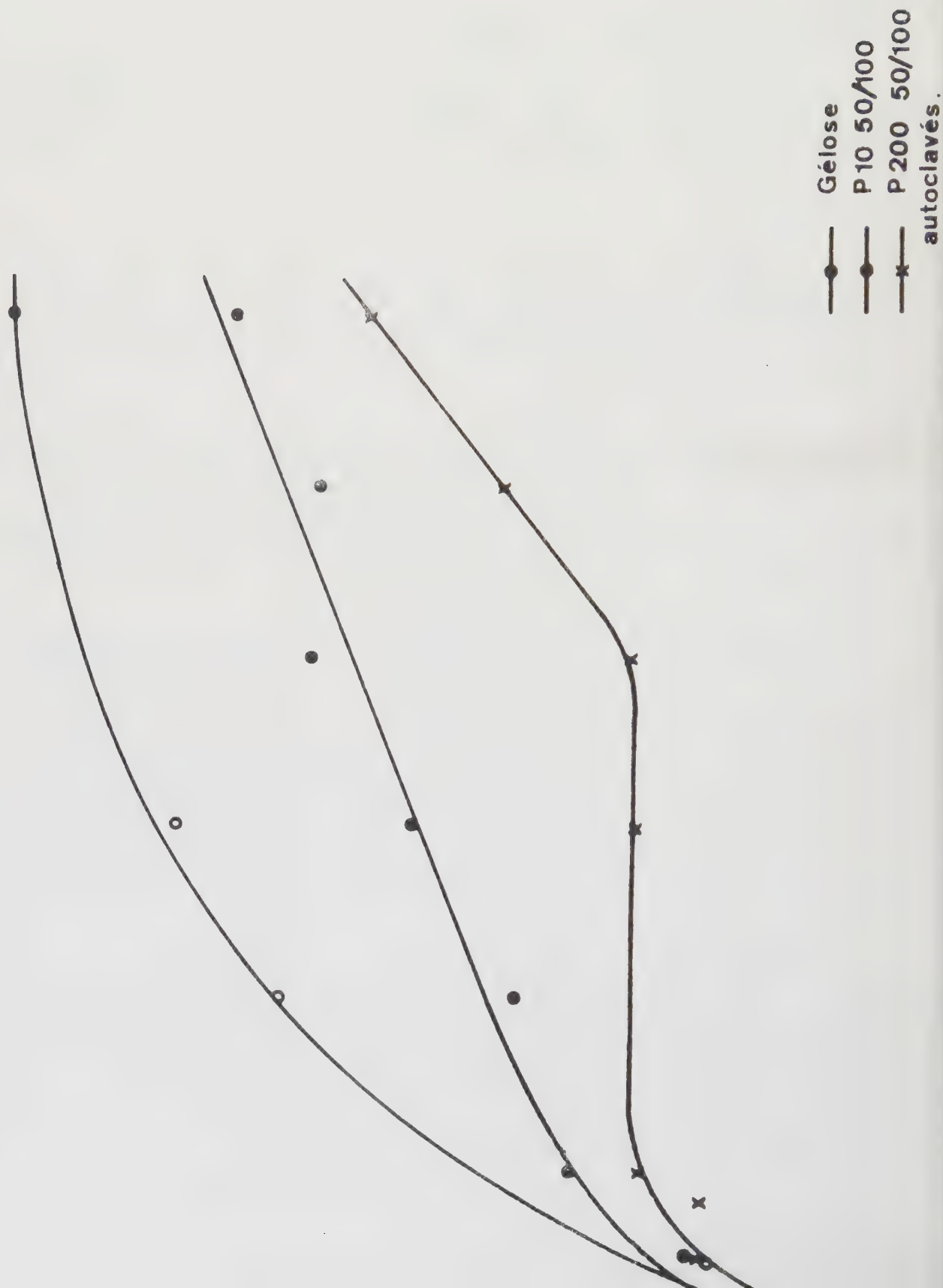
	Gélose	P ₁₀ 50/100	P ₂₀₀ 50/100
8 heures	117,8	87,9	114,4
24 heures	245,3	171,6	179,8

C. Expériences avec les silico-gels

Ces essais ont consisté à comparer l'absorption du phosphore marqué par des colonies développées sur milieu liquide, sur milieu gélosé (à titre indicatif) et sur une plaquette de silico-gel, interposée entre le liquide nutritif et le tissu. Douze colonies sont prélevées après 4, 8, 15 et 30 jours par les mesures de radioactivité.

absorbé
μg/g sec

Fig.31.



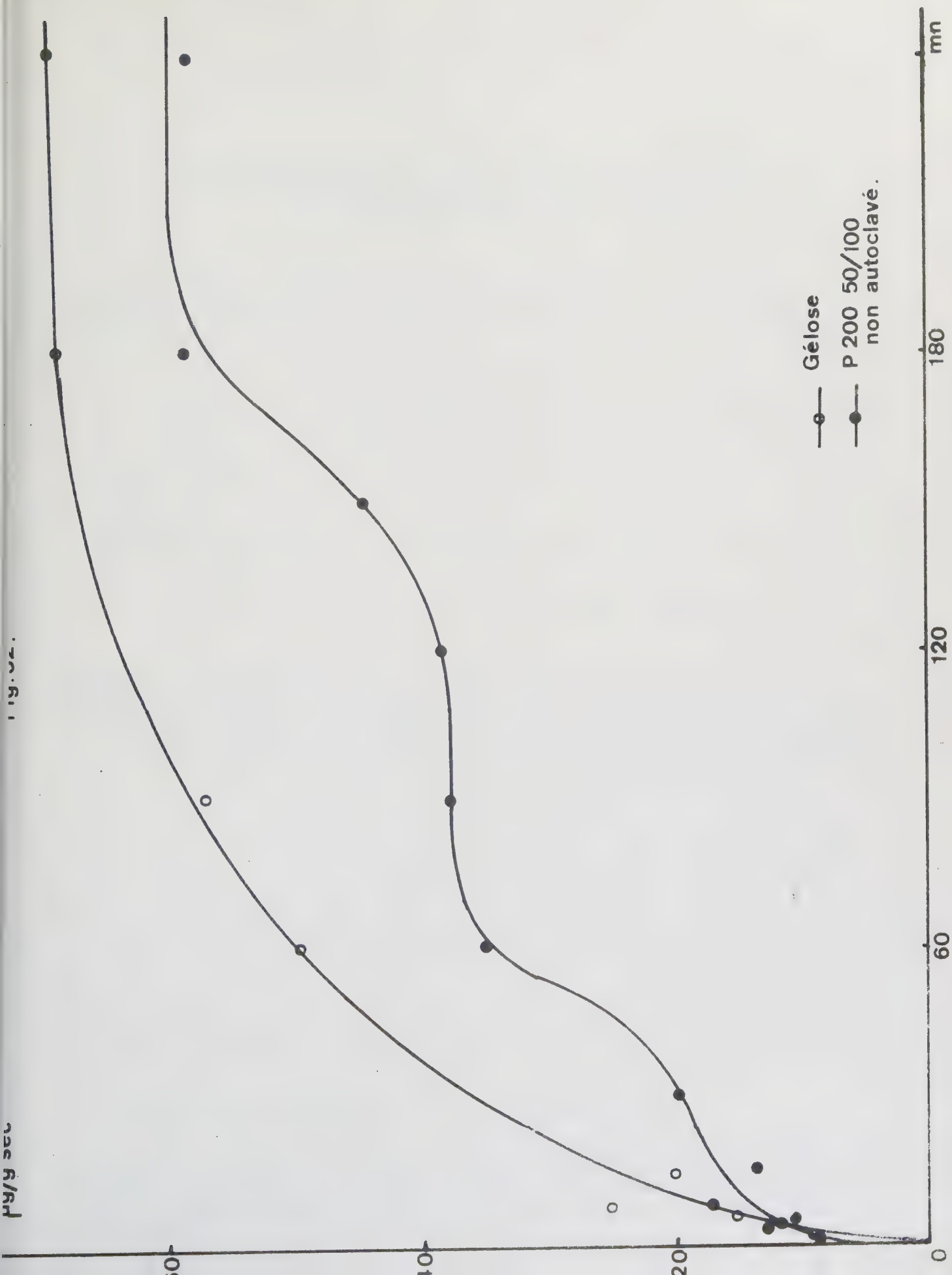


Tableau XIX

Influence de la nature du support sur l'absorption du
Phosphore marqué par les tissus de Carotte

(Résultats en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche)

Temps en jours	Milieu gélosé	Silico-gel	Solution nutritive
4	0,76	0,74	0,40
8	0,97	0,90	0,63
15	1,8	1,8	0,89
30	2,2	2,2	1,40

Une plaquette de silico-gel intercalée entre la solution nutritive et les tissus permet donc une aussi bonne alimentation qu'un milieu gélosé homogène.

D. Conclusion

La structure colloïdale du support est plus favorable à la croissance que le milieu liquide. Cette amélioration semble correspondre à une stimulation de l'absorption. Cependant les bio-gels qui permettent une meilleure croissance que la gélose entraînent une absorption du phosphore plus lente.

Chapitre IX. - INFLUENCE DE LA NATURE DU SUPPORT SUR LA PROTEOGENESE ET SUR L'INTENSITE RESPIRATOIRE

Les colloïdes agissant sur la croissance des tissus et sur la seconde phase de l'absorption, il était intéressant d'étudier leur action sur la protéogénèse et sur l'intensité respiratoire.

A. Influence des colloïdes sur la protéogénèse

On prélève 24 colonies dont 12 ayant poussé sur solution nutritive et 12 sur milieu gélosé. Pour chaque lot, les colonies sont pesées, desséchées aux infra-rouges, puis broyées. On divise la poudre obtenue en deux fractions, sur l'une on dose l'azote total, sur l'autre l'azote protéique après précipitation à l'acide trichloracétique.

Résultats : Tableau XXI.

Tableau XX

Influence de la nature du support sur la protéogénèse
(Résultats donnés en μg d'azote par mg de matière sèche)

Age des colonies (en jours)	MILIEU GELOSÉ			MILIEU LIQUIDE		
	NP	NT	NP/NT.100	NP	NT	NP/NT.100
7	10,5	16	65	8,2	13	63
14	10,9	18	60,5	9,6	16	60
28	11,5	21	54,7	10,7	18,6	56
60	10,4	18	57,7	8,3	15	55

Nous constatons que les teneurs des tissus en azote total et en azote protéique sont plus élevées sur milieu gélosé que sur milieu liquide. Toutefois le rapport NP/NT.100 reste à peu près identique. La nature du support n'influence donc pas la protéogénèse.

B. Influence des colloïdes sur l'intensité respiratoire

On prélève 24 colonies âgées de 15 jours dont 12 ayant poussé sur solution nutritive et 12 sur milieu gélosé. On les met dans des fioles de Warburg à raison de 2 colonies par fiole. On place 0,5 ml de KOH à 20 % dans le récipient central et l'on mesure l'absorption d'oxygène grâce à un manomètre.

Résultats : figure 33.

Les colonies s'étant développées sur milieu gélosé respirent beaucoup plus activement que celles ayant poussé sur milieu liquide.

C. Conclusion

Compte-tenu de ce que le milieu liquide conduit à une croissance plus faible et à une respiration moins intense que le milieu gélosé, il est permis de penser qu'il provoque, entre autres conséquences, une certaine asphyxie. Comme la protéogénèse n'est pas affectée (à croissance égale) c'est manifestement le catabolisme énergétique qui est en jeu.

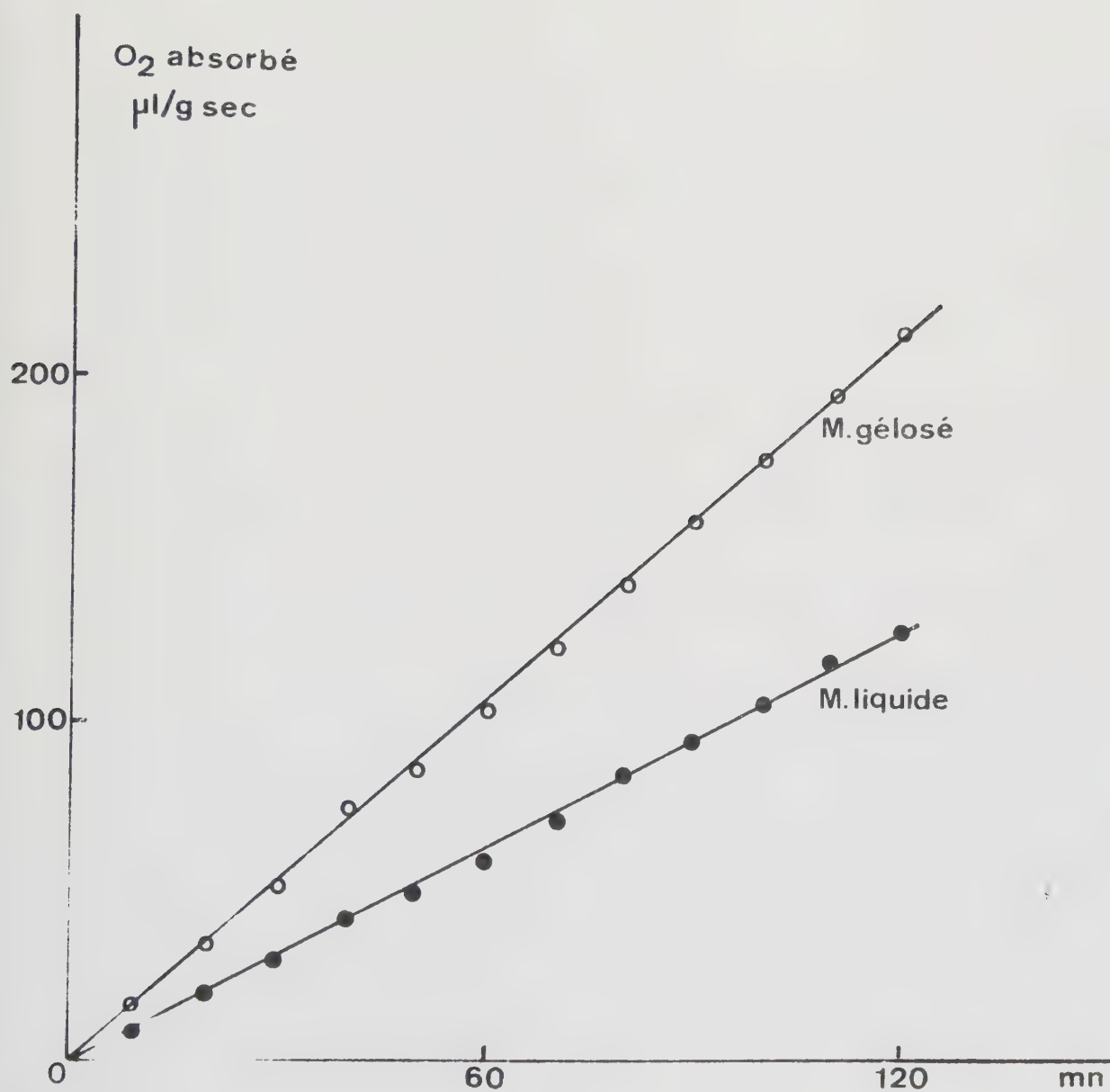


Fig.33. Influence de la nature du support sur l'intensité respiratoire de colonies âgées de 15 jours.

DISCUSSION GENERALE

Les recherches que nous avons entreprises tendaient à reprendre l'étude de l'absorption et de l'exsorption sur un matériel particulièrement favorable puisqu'il permet d'éviter la plupart des causes de variabilité affectant l'expérimentation sur plantes entières. Ce matériel nous a permis d'analyser le déroulement de l'absorption et de l'exsorption dans diverses conditions et l'influence sur les échanges ioniques de facteurs variés : inhibiteurs métaboliques, substances de croissance, nature physique du substrat. Ce dernier point était particulièrement intéressant à aborder puisqu'il n'avait encore fait l'objet d'aucune recherche systématique.

Pour rester dans des conditions physiologiques normales, nous avons opéré avec de jeunes explantats en croissance active, issus ~~normaux~~ de colonies normalement entretenues, évitant ainsi les phénomènes de saturation qui interviennent dans les tissus âgés et les stimulations qu'auraient induites des insuffisances nutritionnelles préalables.

I. L'ABSORPTION EN DEUX PHASES PRISE COMME MODELE DE REFERENCE

Nous avons retrouvé pour les tissus isolés, avec un anion (l'ion phosphorique) et un cation (le potassium) les deux phases dont la description est devenue classique depuis les travaux de STEWARD et HARRISON (1939), STILES et SKELDING (1940), EPSTEIN et LEGGETT (1954) : la première phase se déroule à vitesse initialement élevée, mais devient rapidement nulle, la seconde phase est à vitesse plus lente, mais se prolonge pendant plusieurs heures. Seule la première phase subsiste aux basses températures, en présence de cyanure de potassium (CNK) ou de 2,4-dinitrophénol (DNP). Si l'on retient ces critères comme définition provisoire du caractère passif, c'est-à-dire relativement indépendant des relations métaboliques - dont beaucoup font intervenir des enzymes sensibles au cyanure ou font appel à des phosphorylations découplées par le DNP - nous qualifierons cette première phase de passive, en opposition avec la seconde dite active, selon ces mêmes critères.

Pour le calcium, les avis des auteurs étaient très partagés. En 1954, EPSTEIN et LEGGETT étudiant les antagonismes entre le strontium et le calcium ont conclu à un transport actif de ce dernier. CHASSON et LEVITT (1957) ont admis également un transport actif du calcium. Leur conclusion repose sur l'étude, en fonction du temps, de l'incorporation du $^{45}\text{Ca}^{++}$ par des tubercules de Pomme de terre. En 1961, MOORE, JACOBSON et OVERSTREET travaillant sur les racines excisées d'Orge ont montré que CHASSON et LEVITT interprétaient comme une phase de transport actif ce qui n'était en réalité qu'un échange isotopique lent, l'action de la tempéra-

ture et celle du DNP leur permettant d'affirmer que l'absorption du calcium n'est pas liée au métabolisme cellulaire. Les études de SALSAC (1966) sur les racines excisées de Lupin et de Féverole et nos propres résultats viennent confirmer ce point de vue. Nous avons en effet constaté que la courbe d'absorption ne se prolonge pas par la partie linéaire de pente constante qui caractérise habituellement la phase d'absorption active et qui est nettement visible pour le phosphore et le potassium, mais par une droite horizontale traduisant un taux de calcium constant. En outre les quantités absorbées sont de même ordre à 18° et à 5°.

Sans doute se produit-il nécessairement une métabolisation du calcium, susceptible de faire repartir l'absorption, mais le processus n'intervient qu'après plusieurs heures et ne constitue plus l'absorption proprement dite.

En conclusion, l'étude de l'incorporation du phosphore et du potassium semble bien montrer l'existence pour l'absorption de deux phases l'une active l'autre passive, cette dernière existant seule pour le calcium, et le schéma classique peut être pris comme modèle de référence pour l'analyse plus précise des faits observés.

II. FAITS OBSERVÉS ET PROCESSUS IMPLIQUÉS

A. L'exsorption et les phénomènes d'échange

Nous avons montré l'existence d'une exsorption importante, mise en évidence sur les ions phosphoriques marqués au ^{32}P . Rappelons que ce terme, introduit par HELLER (1962), est l'antinomique d'absorption, préférable à désorption qui lui est contraire de l'adsorption.

La difficulté de l'étude de l'exsorption provient du fait que pendant qu'elle se déroule, la réabsorption n'est pas négligeable. Aussi avons-nous usé de deux techniques : celle généralement utilisée qui laisse se dérouler l'exsorption pendant plusieurs heures dans le même milieu et l'autre, beaucoup plus précise qui consiste à renouveler le milieu toutes les minutes (GABET, 1960). Toutefois cette seconde méthode rend difficile l'étude des échanges, que l'on ne peut guère mesurer que par les quantités de ^{32}P émises dans le milieu, lesquelles sont délicates à apprécier sur des temps très courts. Aussi pour ces problèmes nous avons préféré la première méthode malgré ses imperfections.

Les masses exsorbées sont importantes (au minimum le sixième de ce qui est absorbé en deux heures) et semblent correspondre aux quantités absorbées pendant les cinq premières minutes.

L'exsorption est insensible à la température. Sur ce point, les tissus isolés diffèrent des plantes entières (GABET et HELLER, 1962) pour lesquelles l'exsorption est très sensible à la température, mais ils se rapprochent des racines excisées (VALLEE, 1963). Cela semblerait indiquer que le caractère actif de l'exsorption, signalé par GABET et HELLER pour les plantules, a son origine au niveau de l'organisme végétal et non pas au niveau de l'organe ou de la cellule. Dans le cas de l'organisme une certaine réalimentation des racines peut être opérée à partir des parties aériennes

et se serait cette réalimentation qui serait liée au métabolisme, l'exsorption elle-même étant passive. Ce fait est en accord avec les vues de la plupart des auteurs qui assimilaient l'exsorption à la réversibilité de la première phase de l'absorption.

En milieu complet, les courbes d'exsorption en fonction du temps présentent deux pics. Ceux-ci disparaissent en milieu sans phosphore ce qui suggère qu'ils sont dûs à des échanges isotopiques. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'on ne les observe pas sur la courbe d'exsorption en présence de phytate (dont le phosphore est peu échangeable). Les pics semblent donc liés à la présence d'ions phosphoriques libres dans le milieu.

La valeur quantitative de ces pics est douteuse. Si la phase ascendante s'explique sans difficulté par une stimulation de l'exsorption, la redescende ne peut être due qu'à une réabsorption ; or l'absorption telle que nous l'avons observée à 5° est insuffisante pour justifier l'ampleur des redescendentes constatées. Il est probable que la méthodologie employée tendant à maintenir le volume constant a conduit à des hausses successives de la teneur en ions phosphoriques accélérant la réabsorption. Cela a accusé la redescende des pics. Mais leur existence reste indiscutable et souligne l'importance des phénomènes d'échange dans l'exsorption.

Un fait curieux révélé par ces études est que les pics se produisent à des moments bien précis après la mise en exsorption, ce qui amène à supposer l'existence de sites successivement atteints par les ions venant de l'extérieur et libérant les ions en place. Avec des suspensions cellulaires d'Erable, GRIGNON (1969) a retrouvé de tels pics sur la courbe d'exsorption du magnésium en fonction du temps quand il introduit un autre cation (potassium ou calcium) dans le milieu.

B. L'action de l'auxine et du DNP sur la perméabilité membranaire

La présence de DNP dans le milieu d'exsorption augmente considérablement les quantités de phosphore exsorbées. Celles-ci sont d'autant plus importantes que la température est plus élevée. Or nous avons vu que l'exsorption elle-même est insensible à la température. L'hypothèse la plus vraisemblable est donc celle d'une action métabolique sur la structure de la membrane. HIATT et LOWE (1967) ont démontré sur des racines d'Orge que le DNP qui est un transporteur de protons agissait directement sur la structure membranaire, peut-être en perturbant l'équilibre entre les ions Ca^{++} et H^+ . On sait en effet que cet équilibre influe sur l'absorption des autres cations (RAINS, SCHMID et EPSTEIN, 1964) comme sur leur exsorption (MARSCHNER, HANDLEY et OVERSTREET, 1966), et GRIGNON (1969) a montré sur les suspensions cellulaires d'Erable que l'efflux augmente très rapidement dès que le pH s'abaisse en dessous de 2.

Les acides β -indolyl-acétique (AIA) et 2,4-dichlorophénoxy-acétique (2,4-D) favorisent aux doses moyennes l'absorption du phosphore et du potassium par les cultures de tissus de Carotte. L'AIA est sans action pour les tissus de Crown-gall, freine l'absorption de ces éléments par les racines adultes, l'accéléralant légèrement pour de très jeunes racines (4 jours).

Ces résultats conduisent à penser que l'action de l'auxine est liée à sa concentration dans les cellules. Nous savons en effet que cette dernière est faible pour les tissus normaux (GAUTHERET, 1959), élevée pour les tissus tumoraux (KULESCHA, 1951, STONIER, 1969), tandis qu'elle est très forte pour les racines adultes, augmentant régulièrement au cours de leur croissance (PILET, 1957, 1961).

Les effets observés sur les échanges étant rapides (60 ou 120 minutes) nous devons envisager une action directe sur la perméabilité de la membrane. Sur des hypocotyles UHRSTRÖM (1969) a constaté que l'AIA produit en moins de 4 minutes une diminution du coefficient de Young :

$$E = \frac{F \cdot L}{A \cdot \Delta L}$$

où F est la force appliquée, L, la longueur, ΔL , l'élongation irréversible et A, la surface de la section) tandis qu'un allongement n'est visible qu'après 6 minutes. Il émet l'hypothèse qu'un des effets primaires de l'auxine consiste en un relâchement de la membrane primaire. Il est évident que l'extension et le changement de direction des microfibrilles (d'une position transversale à une position longitudinale) peuvent se produire très rapidement. MASUDA et WADA (1966) ont constaté une élongation cellulaire dans les 6-12 minutes qui suivent l'application de l'auxine à des coléoptiles d'Avoine et CLELAND (1967) a obtenu sur le même matériel une augmentation de la plasticité des membranes après 20 minutes. Ils ont observé que le calcium à des doses supra-optimales inhibe la croissance et l'extensibilité des parois en leur donnant une structure trop rigide. L'AIA ne contrôlerait pas seulement l'équilibre entre les fonctions S-H et S-S de l'extensine membranaire, comme le suggérait LAMPORT (1965) et comme semblent l'indiquer de récentes observations sur les racines de Lens (PILET et ZRYD, 1965) et les cultures *in vitro* de Carotte (PILET et DUBOIS, 1968), mais interviendrait dans l'utilisation de l'hydroxyproline constitutive (CLELAND et OLSON, 1967).

Cependant il n'est pas possible d'admettre que cette modification de membrane se réduise à des phénomènes mécaniques. Nous avons vu la relation entre les effets de l'auxine et la température ; nous avons vu aussi que l'action de l'auxine, comme celle du DNP, porte sur la deuxième phase, non réversible, de l'absorption ; enfin rappelons que les effets de l'auxine sur l'absorption et sur l'exsorption sont opposés. Il nous faut donc admettre une modification polarisée de la membrane. Celle-ci pourrait se situer simplement au niveau des charges qu'elle porte de part et d'autre ; nous avons vu plus haut l'importance que leur accordaient plusieurs auteurs à propos de l'effet du DNP. Il se pourrait aussi qu'il s'agisse d'un mécanisme enzymatique, nécessairement différent suivant le lieu de son intervention. Or l'existence de relations spécifiques entre l'action d'élongation de l'auxine et l'activité RNA-ase et, par conséquent, le métabolisme du RNA semble maintenant largement démontrée (TRUELSEN, 1967; PILET, 1969). D'autre part DAVIES et MAC LACHLAN (1968) ont observé sur des épicotyles de Pois que la synthèse de la cellulase semble contrôlée par l'AIA. L'enzyme transportée à la membrane provoquerait l'élongation. Les phénomènes constatés pourraient donc s'expliquer par une modification enzymatique des propriétés de la membrane sous le contrôle du RNA.

C. L'action du support

Nous avons constaté après HELLER (1951) qu'un milieu nutritif possédant une structure colloïdale (gélose ou silico-gel) est plus favorable à la croissance que le même milieu à l'état liquide. La première idée qui vient à l'esprit (HELLER, 1953) pour expliquer cette action est que la phase colloïdale crée de meilleures conditions de nutrition par suite des échanges directs qu'elle permet entre les colloïdes du milieu et la surface des tissus par le jeu d'un mécanisme analogue à celui imaginé par JENNY et OVERSTREET (1939) et invoqué dans les rapports plante-sol par BLANCHET, CHAUMONT et STUDER (1962) et les auteurs qui se sont intéressés à la capacité d'échange des cations racinaires (CECR: Mme BLANC, 1955, 1958; WACQUANT, 1969). Ceci paraissait parfaitement plausible vu l'importance de ces échanges que nous avons observés aussi bien pour le potassium que pour les ions phosphoriques, ces derniers facilement adsorbés sur les colloïdes par l'intermédiaire du calcium.

Mais si les colloïdes favorisent l'absorption, c'est sur sa phase active qu'ils agissent. Ceci rejoint le fait que les colonies respirent plus facilement sur gélose que sur milieu liquide. On pourrait donc supposer que l'effet dépressif du milieu liquide est dû à un certain caractère asphyxiant signalé par GAUTHERET (1934) sur le tissu cambial d'arbre et par Mlle RICHEZ sur les tissus de Carotte (1965).

Un tel mécanisme joue certainement. Cependant le fait que les colonies sur bio-gels ont une croissance beaucoup plus active que sur gélose alors qu'elles absorbent les ions phosphoriques plus lentement nous amène à dissocier dans une certaine mesure les effets sur la croissance et sur l'absorption. De plus la présence sur la courbe d'absorption de paliers déjà signalés par VALLEE, 1963 ; MOORE, OVERSTREET, JACOBSON, 1961 ; BEN SIMON, 1960 ; GRIGNON, 1969 ; GRIGNON et SALSAC, 1969) amène à supposer l'intervention des échanges dans la phase dite active. On pourrait même supposer que si les bio-gels permettent une meilleure croissance que la gélose avec une absorption plus lente, c'est parce qu'ils permettent une meilleure saturation des sites.

Nous retrouvons donc à nouveau l'idée signalée à plusieurs reprises d'une intervention plus ou moins importante des phénomènes d'échange dans la phase active, ce qui nous conduit à reconsidérer quelque peu cette notion.

III. INTERPRETATION GENERALE

En définitive si un certain nombre de nos résultats peuvent s'inscrire dans le modèle de référence que nous avons adopté au départ (l'absorption en deux phases, l'une active, l'autre passive) d'autres appellent une interprétation différente.

Nous avons vu que l'AIA dont nous avons expliqué l'action par un effet de membrane agissait essentiellement sur la seconde phase de l'absorption. Nous avons constaté que l'influence du DNP sur l'exsorption est sensible à la température. Nous avons observé que si les colloïdes favorisent la croissance, leur action concerne la seconde phase de l'absorption.

Enfin les études avec les bio-gels ont montré l'importance de la structure du milieu pour la croissance des tissus. Autant de facteurs qui dans la théorie classique ne devraient agir que sur la phase passive et dont le type d'action est de ceux qui intéressent la phase active. Tous ces faits amènent à se demander si d'autres modèles ne pourraient pas être imaginés, basés non plus sur une analogie avec une cinétique enzymatique de type Michaélien mais, au moins pour les cations et les ions phosphoriques, sur des phénomènes d'adsorption et de désorption sur des sites placés à la surface des membranes ou des autres organites.

C'est sur la répartition et la structure de ces sites qu'agirait le métabolisme qui interviendrait par l'intermédiaire des propriétés physiques des cations et des structures adsorbantes et non par une réaction chimique. MERTZ et LEVITT (1961) ont démontré que le calcium adsorbé à la surface des cellules de Pomme de terre est disponible pour l'incorporation dans les mitochondries. SCHAEDEL et JACOBSON (1965) ont montré que l'absorption du potassium par les Chlorelles comporte une adsorption rapide suivie d'une diffusion lente vers l'extérieur, la quantité de cations accumulés dépendant de la quantité d'acides organiques non diffusibles synthétisés dans la cellule. En outre l'adsorption exige de l'énergie et les constantes d'activation sont déjà suffisamment élevées pour entraîner un effet appréciable de la température. GRIGNON (1969) pour l'absorption du potassium par des suspensions cellulaires d'Erable a montré que l'action de la température ne pouvait servir d'indice de mécanisme actif au moins jusqu'à 1h30 d'absorption.

Nos études portèrent uniquement sur les cinétiques en fonction du temps et devront se poursuivre en fonction des doses, ce qui permettra des comparaisons plus précises avec un modèle Michaélien. Mais rappelons que GRIGNON (1969), GRIGNON et SALSAC (1969) sur un matériel très proche des cultures de tissu ont obtenu des résultats difficilement compatibles avec le modèle Michaélien et que THELLIER (1968, 1969) a imaginé un modèle mathématique, calqué sur la théorie des conducteurs ohmiques et des semi-conducteurs, qui épousent les courbes expérimentales d'EPSTEIN et qui échappe à une partie des critiques adressées à ce modèle. On doit cependant remarquer que la conception qui porte sur des liaisons de nature enzyme-substrat avec des transporteurs mobiles et celle, appuyée par notre travail, d'adsorptions et de désorptions successives, n'est pas en opposition absolue (HELLER, 1969) puisque l'une et l'autre envisagent des fixations réversibles nécessitant de l'énergie (sans doute fournie par de l'ATP) et ne diffèrent que par la nature et le comportement des sites.

Quoi qu'il en soit, notre travail a mis l'accent sur l'importance des phénomènes d'échange dans la phase active comme dans la phase passive. Si nous avons été amenés, comme plusieurs auteurs récents, à les faire jouer dans les phénomènes de l'absorption, c'est peut-être parce que nous ne nous sommes pas limités à un milieu homogène mais avons fait intervenir dans nos comparaisons un milieu hétérogène. Mais dans la plante comme dans le sol ce sont les milieux structurés qui, plus encore que les solutions, règlent l'absorption.

CONCLUSIONS GENERALES

Ce travail avait pour but d'étudier les échanges des tissus isolés avec leur milieu et l'influence de quelques facteurs sur ces phénomènes : présence d'inhibiteurs ou de substances de croissance, nature physique du support.

Nous avons retrouvé pour les tissus isolés, avec le phosphore et le potassium, les deux phases classiques de l'absorption : une phase rapide ne concernant que les premières minutes et une phase plus lente se prolongeant pendant plusieurs heures. La première subsiste seule aux basses températures ; elle fut donc qualifiée de passive.

Pour le calcium, après la phase initiale, on aboutit à un plateau traduisant un arrêt de l'absorption, ceci quelle que soit la température. L'absorption du calcium est donc essentiellement passive (MOORE, JACOBSON et OVERSTREET, 1961) contrairement à ce que pensaient CHASSON et LEVITT (1957). Elle semble s'effectuer en deux temps comme l'avait vu SALSAC (1966) sur les racines.

Nous avons montré l'existence, pour les cultures de tissus d'une exsorption importante. Cette exsorption, en milieu renouvelé, est insensible aux variations de température et au cyanure de potassium, elle est donc essentiellement passive. Par contre, la présence de 2,4-dinitrophénol (DNP) dans le milieu d'exsorption augmente considérablement les quantités exsorbées et cette action est sensible à la température. Nous avons expliqué ceci (après PETERSON, 1961 et VALLEE, 1963) par une augmentation de la perméabilité cellulaire. Pour MITCHELL (1961) le DNP qui semble être un transporteur de protons empêche le bon fonctionnement de la membrane en modifiant l'équilibre des ions H^+ et OH^- sur chacune de ses deux faces.

Les acides β indolyl-acétique et 2,4-dichlorophénoxy-acétique favorisent, aux doses moyennes, l'absorption du phosphore et du potassium. Ceci confirme les résultats de HIGINBOTHAM, LATIMER et EPPLEY (1953) mais nous avons montré en outre que cette action est métabolique ; elle disparaît aux basses températures et intéresse la seconde phase de l'absorption. Par contre l'acide β indolyl-acétique freine l'absorption de ces mêmes éléments par les racines isolées de Pois adultes, il est sans action sur les échanges entre les tissus de Crown-gall et leur milieu.

Les différences de comportement entre les trois types de tissus (tissus normaux, tissus tumoraux, racines isolées) sont dues probablement à l'état auxinique endogène : infra-optimal pour les tissus normaux, optimal pour les tissus de Crown-gall (qui synthétisent eux-mêmes leur auxine) et supra-optimal pour les racines isolées adultes. Le fait qu'un prétraitement à l'auxine a le même effet qu'un traitement court et que les racines très jeunes (4 jours) ont un comportement différent des racines adultes vient à l'appui de cette hypothèse.

Nous avons constaté qu'un milieu nutritif possédant une structure colloïdale est plus favorable à la croissance que le même milieu à l'état liquide. Pour la gélose, nous avons pu montrer que cette action sur la croissance s'accompagne d'une stimulation de l'absorption des éléments minéraux. Cette stimulation porte sur la phase active de l'absorption, les échanges passifs se faisant au contraire plus rapidement sur milieu liquide. D'autre part, les tissus respirent plus activement sur gélose que sur solution nutritive. Ces résultats sont en accord avec ceux de GAUTHIERET (1934) sur le tissu cambial d'arbre et de RICHEZ (1965) sur les tissus de Carotte et permettent de penser que le milieu liquide provoque une certaine asphyxie des tissus.

Mais d'autre part les expériences avec les bio-gels ont permis de retrouver les points d'inflexion signalés par GRIGNON et SALSAC (1969) avec les racines et les cellules isolées sur les courbes d'absorption en fonction temps. Aussi sans adopter entièrement les vues de JENNY et OVERSTREET et d'autres auteurs (BLANCHET, CHAUMONT et STUDER, 1962) qui voyaient dans l'absorption de simples échanges directs, purement passifs, nous sommes amenés à penser que même l'absorption active fait intervenir pour une part des phénomènes d'échange.

Que l'on accepte ou non la théorie d'EPSTEIN du transport des ions par des vecteurs protéiques, il semble que les phénomènes de migration des ions sur des sites chargés doivent être pris en considération. Ainsi l'opposition entre phase active et phase passive serait-elle moins importante qu'on a pu le croire pendant un temps.

BIBLIOGRAPHIE

- ALBERSHEIM P. et BONNER J. (1959). - Metabolism and hormonal control of pectic substances. J. Biol. Chem., 234, 3105-3108.
- BELHANAFI A. (1964). - Effets de quelques chélateurs et de l'acide β -indolyl-acétique sur la croissance et le catabolisme auxinique des racines. Thèse Fac. Sci., Lausanne, 129 p.
- BEN SIMON F. (1960). - Contribution à l'étude de l'absorption des ions rubidium et phosphoriques par des racines d'Orge excisées. D.E.S. Paris, 66 p.
- BERNSTEIN L. et NIEMAN R.H. (1960). - Apparent free space of plant roots. Plant Physiol., 35, 589-598.
- BLANC D. (1955). - Etudes préliminaires sur l'adsorption radiculaire des cations. Ann. Agron., 4, 615-633.
- BLANC D. (1958). - Influence de la nutrition azotée sur les propriétés d'échange des racines. C.R. Acad. Sci., 246, 2035-2037.
- BLANCHET R., CHAUMONT C. et STUDER R. (1962). - Alimentation phosphorique des plantes et phénomènes de contact racines-particules de sol. Ann. Agron., 13, 21-29.
- BRIGGS G.E., HOPE A.B. et PITMAN M.G. (1958). - Exchangeable ions in beet disks at low temperature. J. Exper. Bot., 9, 128-141.
- BRIGGS G.E. et ROBERTSON R.N. (1957). - Apparent free space. Annu. Rev. Plant Physiol., 8, 11-30.
- BROOKS S.C. (1937). - Selective accumulation with reference to ion exchange by the protoplasm. Trans. Faraday Soc., 55, 1002-1006.
- BROYER T.C. et OVERSTREET R. (1940). - Cation exchange in plant roots in relation to metabolic factors. Amer. J. Bot., 27, 425-430.
- BRUNSTETTER B.C., MYERS A.T., MITCHELL J.W., STEWART W.S. et KAUFMAN M.W. (1948). - Mineral composition of bean stems treated with 3-indole acetic acid. Bot. Gaz., 109, 268-276.
- BUTLER G.W. (1953a). - Ion uptake by young wheat plants. Time course of the absorption of potassium and chloride ions. Physiol. Plant., 6, 594-616.
- BUTLER G.W. (1953b). - Ion uptake by young wheat plants. II. The apparent free space of wheat roots. Physiol. Plant., 6, 613-635.
- CHASSON R.M. et LEVITT J. (1957). - Investigation of ion uptake by tissue slices. An improved method of aeration and of determining absorption ratio. Physiol. Plant., 10, 889-897.

- CLAISSE M. (1962). - Contribution à l'étude de l'action de l'acide β indolyl-acétique sur la racine et son fonctionnement ; influence sur l'absorption, l'exsorption et la morphologie des racines de Pois (*Pisum sativum*). D.E.S., Paris, 140 p.
- CLELAND R. (1967). - Extensibility of isolated cell walls : measurement and changes during cell elongation. Planta, 74, 197-209.
- CLELAND R. et OLSON A.C. (1967). - Metabolism of free hydroxyproline in *Avena* coleoptiles. Biochem., 6, 32-36.
- COMMONER B. et MAZIA D. (1942). - The mechanism of auxin action. Plant Physiol., 17, 682-685.
- DAINTY J. et HOPE A.B. (1959). - Ionic relations of cells of *Chara australis*. I. Ion exchange in the cell wall. Austral. J. Biol. Sci., 12, 395-411.
- DASTE Ph. et HELLER R. (1951). - La formation des silico-gels, étude critique et application en microbiologie. Rev. Gén. Bot., 58, 393-410.
- DAVID R. (1952). - Les hormones végétales. Presses universitaires de France, 188 p.
- DAVIES E. et MAC LACHLAN G.A. (1968). - Effects of indole acetic acid on intracellular distribution of β glucanase activities in the Pea epicotyl. Arch. Biochem. Biophys., 128, 595-600.
- DIEHL J.M., GORTER C.J., ITERSON G.V. et KLEINHOONTE A. (1939). - The influence of growth hormone on hypocotyls of *Helianthus* and the structure of their cell walls. Rec. Trav. Bot. Neerl., 36, 709-798.
- DUCET G. et VANDEWALLE G. (1959). - Nouvelles techniques de dosage du phosphore. Ann. Physiol. Vég., 2, 199-206.
- ELGABALLY M. et WIKLANDER M. (1962). - The mechanism of anion uptake by plant roots. Soil Sci., 93, 281-285.
- EMMERT F.H. (1959). - Loss of phosphorus-32 by plant roots after foliar application. Plant Physiol., 34, 449-454.
- EPSTEIN E. (1953). - Mechanism of ion absorption by roots. Nature, 171, 83-84.
- EPSTEIN E. (1955). - Passive permeation and active transport of ions in plant roots. Plant Physiol., 30, 529-535.
- EPSTEIN E. (1966). - Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plants. Nature, 212, 1324-1327.
- EPSTEIN E. et LEGGETT J.E. (1954). - The absorption of alkaline earth cations by barley roots : kinetics and mechanism. Amer. J. Bot., 41, 785-791.
- FIEDLER H. (1936). - Entwicklungs und reizphysiologische Untersuchungen und kulturen isolierter Wurzelspitzen. Z. Bot., 30, 385-436.

- GABET C. (1960). - Quelques aspects de l'exsorption du phosphore chez des plantules cultivées sur milieu liquide. D.E.S., Paris, 103 p.
- GABET C. et HELLER R. (1962). - Quelques aspects de l'exsorption radioactive chez les plantules de Soja hispida. C.R. Acad. Sci., 254, 156-158.
- GALSTON A.W. et PURVES W.K. (1960). - The mechanism of action of auxine. Annu. Rev. Plant Physiol., 11, 239-276.
- GAUTHERET R.J. (1934). - Culture du tissu cambial. C.R. Acad. Sci., 198, 2195-2196.
- GAUTHERET R.J. (1935). - Recherches sur la culture des tissus végétaux: essais de quelques tissus méristématiques. Thèse, Paris, 279 p.
- GAUTHERET R.J. (1959). - La culture des tissus végétaux, techniques et réalisation. Masson éd., Paris, 863 p.
- GRIGNON C. (1969). - Absorption du potassium par des suspensions cellulaires d'Erable Acer pseudoplatanus. Thèse 3^e Cycle, Paris, 121 p.
- GRIGNON C. et SALSAC L. (1969). - Sur le caractère non monotone des courbes d'absorption du potassium en fonction du temps, dans les racines et les cellules isolées. C.R. Acad. Sci., 268, 73-75.
- GUILLAUMIN Ch.O. (1932). - Calcium et calcémie chez l'homme. Bull. Soc. Chim. Biol., 14, 85-196.
- HANDLEY R. et OVERSTREET R. (1961). - Uptake of calcium and chlorine in roots of Zea Mays. Plant Physiol., 36, 766-769.
- HANSON J.B. et BONNER J. (1954). - The relationship between salt and water uptake in Jerusalem artichoke tuber tissue. Amer. J. Bot., 41, 702-710.
- HEATH O.V.S. et CLARK J.E. (1960). - Chelation in auxin action. I. A study of the interactions of 3-indolyl acetic acid and synthetic chelating agents as affecting the growth of wheat roots and coleoptiles sections. J. Exper. Bot., 11, 167-187.
- HELLER (1951). - Sur l'action physique favorable exercée sur la croissance des cultures de tissus végétaux par le contact d'un milieu gélosé ou d'un gel de silice. C.R. Soc. Biol., 145, 675-678.
- HELLER (1953). - Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. Thèse, Paris. Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Vég., 14, 1-223.
- HELLER (1962). - Cours de Physiologie Végétale. C.D.U., Paris, 155 p.
- HELLER (1969). - Introduction. Bull. Soc. Fr. Phys. Vég., 15, 109-114.

- HEVESY G., HOFFER E. et KROGH A. (1935). - The permeability of the skin of the frog as determined by D_2O and H_2O . Skand. Arch. Physiol., 75, 199-214.
- HIATT A.J. et LOWE R.H. (1967). - Loss of organic acids, amino acids, K and Cl from barley roots treated anaerobically and with metabolic inhibitors. Plant Physiol., 42, 1731-1736.
- HIGINBOTHAM N., LATIMER H. et EPPLEY R. (1953). - Stimulation of rubidium absorption by auxins. Science, 118, 243-245.
- HOAGLAND D.R. et BROYER T.C. (1936). - General nature of the process of salt accumulation by roots with description of experimental methods. Plant Physiol., 11, 451-507.
- HOPE A.B. (1953). - Salt uptake by root tissue cytoplasm. The relation between uptake and external concentration. Austral. J. Biol. Sci., 6, 396-409.
- HOPE A.B. et ROBERTSON R.N. (1956). - Initial absorption of ions by plant tissue. Nature, 177, 43-44.
- HOPE A.B. et STEVENS P.G. (1952). - Electric potential differences in bean roots and their relation to salt uptake. Austral. J. Sci. Res., B5, 335-343.
- HYLMÖ B. (1953). - Transpiration and ion absorption. Physiol. Plant., 6, 333-405.
- ILAN I. (1962). - A specific stimulatory action of indolyl-3-acetic acid on potassium uptake by plant cells, with concomitant inhibition of ammonium uptake. Nature, 194, 203-204.
- INGELSTEN B. et HYLMÖ B. (1961). - Apparent free space and surface film determined by a centrifugation method. Physiol. Plant., 14, 157-170.
- JENNY H. et OVERSTREET R. (1939). - Cation interchange between plant root and soil colloids. Soil Sci., 47, 257-272.
- KOCH F.C. et Mc MEEKIN T.L. (1924). - A new direct nesslerization micro-Kjeldahl method and a modification of the Nessler-Folin reagent for ammonia. J. Amer. Chem. Soc., 46, 2066-2069.
- KULESCHA Z. (1951). - Recherches sur l'élaboration de substances de croissance par les tissus végétaux. Thèse, Paris, 114 p.
- LAMPORT D.T.A. (1965). - The protein component of primary cell walls. Advan. Bot. Res., 2, 151-218.
- LAPICQUE L. (1925). - Sur l'absorption des sels par les cellules végétales, épictèse et sélection. Bull. Soc. Chim. Biol., 7, 621.

- LATIES G.G. (1959). - Active transport of salt into plant tissue. Annu. Rev. Plant Physiol., 10, 87-112.
- LEMATTE L., BOINOT G. et KAHANE E. (1927). - Dosage des minéraux contenus dans les principaux organes utilisés en opothérapie. J. Pharm. Chim., 8^e série, 5, 325-331.
- LEVITT J. (1957). - The significance of "apparent free space" in ion absorption. Physiol. Plant., 10, 882-888.
- LOOMIS W.F. et LIPMAN J.F. (1948). - Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxidation. J. Biol. Chem., 173, 807-808.
- LUNDEGÅRDH H. (1954). - Anion respiration. The experimental basis of a theory of absorption transport and exudation of electrolytes by living cells and tissues. Symp. Soc. Exp. Biol., 8, 262-296.
- LUNDEGÅRDH H. (1958). - Investigations on the mechanism of absorption and accumulation of salts : II. Absorption of phosphate by potato tissue. Physiol. Plant., 11, 564-571.
- LUNDEGÅRDH H. (1959). - Investigations on the mechanism of absorption and accumulation of salts. V. Retention and elution of absorbed salts. Physiol. Plant., 12, 342-352.
- MAAS E.F. (1969). - Calcium uptake by excised maize roots and interactions with alkali cations. Plant Physiol., 44, 985-989.
- MACHEBOEUF M. et DELSAL J. (1943). - Sur le dosage de très petites quantités de phosphore dans des matières organiques. Bull. Soc. Chim. Biol., 25, 116-119.
- MACHLIS L. (1944). - The influence of some respiratory inhibitors and intermediates on respiration and salt accumulation of excised roots. Amer. J. Bot., 31, 183-192.
- MALYSHEV N. (1932). - Das Wachstum des isolierten Wurzelmeristems auf sterilen Nährböden. Biol. Zbl., 52, 257-265.
- MARSCHNER H., HANDLEY R. et OVERSTREET R. (1966). - Potassium loss and changes in the fine structure of corn root tips induced by H-ion. Plant Physiol., 41, 1725-1735.
- MASUDA Y. (1958). - Auxinwirkung auf die Stöckung und den Na Ausgang von NaCl reichen Avena Kuleoptilen. J. Inst. Polytech. Osaka City Univ., D.9., 1-86.
- MASUDA Y. (1967). - Auxin-induced expansion growth of Jerusalem artichoke tuber tissue in relation to nucleic acid and protein metabolism. Ann. New-York Acad. Sci., 144, 68-80.

- MASUDA Y. et TANIMOTO E. (1967). - Effect of auxin and antiauxin on the growth and RNA synthesis of etiolated pea internode. Plant Cell Physiol., 8, 459-465.
- MASUDA Y. et WADA S. (1966). - Requirement of RNA for the auxin-induced elongation of oat coleoptile. Physiol. Plant., 19, 1055-1063.
- MENGEL K. (1961). - Die Donnanverteilung der Kationen im freien Raum der Pflanzenwurzel und ihre Bedeutung für die aktive Kationenaufnahme. Z. Pflanzenernähr. Düngung Bodenkde., 95, 240-259.
- MENGEL K. (1962). - Der Einfluss des Stoffwechsels auf die Aufnahme und Verteilung von markiertem Kalium bei Sonnenblumen. Z. Pflanzenernähr. Düngung Bodenkde., 98, 57-63.
- MERTZ D. et LEVITT J. (1961). - The relation between ion adsorption on the cell wall and active uptake. Physiol. Plant., 14, 57-61.
- MIDDLETON L.J. et RUSSEL R.S. (1958). - The interaction of cations in absorption by plant tissues. J. Exper. Bot., 9, 115-127.
- MILTHORP J. et ROBERTSON R.N. (1948). - Studies on the metabolism of plant cell. VI. Salt respiration and accumulation in barley roots. Austral. J. Exper. Biol. Med. Sci., 26, 189-197.
- MITCHELL P. (1961). - Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature, 11, 144-148.
- MOORE D.P., JACOBSON L. et OVERSTREET R. (1961). - Uptake of calcium by excised barley roots. Plant Physiol., 36, 53-57.
- MOURAVIEFF I. (1962). - Action de la lumière sur la cellule végétale. III. Influence de l'acide indole-acétique, de l'acide gibbéréllique et d'un certain nombre d'autres substances sur l'adhérence protoplasme-membrane. Rev. Gén. Bot., 69, 169-185.
- NIKLEWSKI B. (1933). - Über den Einfluss von Kolloidstoffen auf die Entwicklung einiger Kulturpflanzen. Jb.f.wissensch. Bot., 78, 431-482.
- ORDIN L., CLELAND R. et BONNER J. (1955). - Influence of auxin on cell-wall metabolism. Proc. Nation. Acad. Sci., 41, 1023-1029.
- ORDIN L. et JACOBSON L. (1955). - Inhibition of ion absorption and respiration in barley roots. Plant Physiol., 30, 21-27.
- OSTERHOUT W.J.V. (1931). - The accumulation of electrolytes. II. Suggestions as to nature of accumulation in Valonia. J. Gen. Physiol., 14, 285-300.
- OSTERHOUT W.J.V. (1952). - The mechanism of accumulation in living cells. J. Gen. Physiol., 35, 579-584.

- OVERSTREET P. et JACOBSON L. (1946). - Absorption by roots of rubidium and phosphate ions at extremely small concentrations as revealed by experiments with Rb^{86} and P^{32} prepared without inert carrier. Amer. J. Bot., 33, 107-112.
- PALMADE M. (1967). - Recherche d'un test de division des cellules chez les tissus végétaux cultivés in vitro. Influence de la nature du support sur la croissance des tissus de Topinambour. D.E.S. Toulouse, 61 p.
- PETTERSON S. (1961). - Ion absorption in young sunflower plants. II. The sulphate uptake in the apparent free space. Physiol. Plant., 14, 124-132.
- PFEIFFER H. (1933). - Über das Migrationsvermögen pflanzlicher Zellen in situ und in vitro. Arch. f. exp. Zellf., 14, 152-169.
- PILET P.E. (1957). - Aspect biochimique du vieillissement des tissus végétaux. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat., 66, 473-476.
- PILET P.E. (1961a). - Les phytohormones de croissance. Paris, Masson éd. 774 p.
- PILET P.E. (1961b). - L'action des auxines sur la croissance des cellules. Hdb. Pflanzenphysiol., XIV, 784-806.
- PILET P.E. (1969). - Action combinée de l'acide β indolyl-acétique et d'une ribonucléase sur la croissance. C.R. Acad. Sci., 268, 930-932.
- PILET P.E. et DUBOIS J. (1968). - Variations du taux en composés sulfhydrylés acidosolubles de tissus cultivés in vitro. Physiol. Plant., 21, 445-454.
- PILET P.E. et ZRYD J.P. (1965). - Distribution des composés sulfhydryles dans les racines. Ann. Phys. Vég., 7, 243-250.
- RAINS D.W., SCHMID W.E. et EPSTEIN E. (1964). - Absorption of cations by roots. Effects of hydrogen ions and essential role of calcium. Plant Physiol., 39, 274-278.
- RICHEZ M. (1965). - Culture de tissus végétaux sur milieu liquide renouvelé ou périodiquement transvasé. C.R. Acad. Sci., 260, 657-660.
- ROBERTSON R.N., WILKINS M.J. et WEEKS D.C. (1951). - Studies in the metabolism of plant cells. IV. The effect of 2,4-dinitrophenol on salt accumulation and salt respiration. Austral. J. Sci. Res., B4, 248-264.
- RUSSEL R.S. et AYLAND M.J. (1955). - Exchange reactions in the entry of cations into plant tissues. Nature, 175, 204-205.
- SALSAC L. (1966). - Absorption du calcium dans les racines de Lupin jaune et de Féverole. C.R. Acad. Sci., 262, 2462-2465.

- SCHAEDLE M. et JACOBSON L.(1965).- Ion absorption and retention by Chlorella pyrenoidosa. I. Absorption of potassium. Plant Physiol., 40, 214-220.
- SKELDING A.D. et REES W.J.(1952).- An inhibitor of salt absorption in the root tissues of red beet. Ann.Bot.N.S., 16, 513-529.
- SKOOG F., BROYER T.C. et GROSSENBACHER K.A.(1938).- Effects of auxin on rates, periodicity and osmotic relations in exudation. Amer.J.Bot., 25, 749-759.
- STENLID G.(1949).- The effect of 2,4-dinitrophenol upon oxygen consumption and glucose uptake in young wheat roots. Physiol. Plant., 2, 350-371.
- STEVENINCK R.F.M.Van (1965).- Effect of indolyl-3-acetic acid on the permeability of membranes in storage tissue. Nature, 205, 83-84.
- STEWART F.C. et HARRISON J.A.(1939).- The absorption and accumulation of salts by living plant cells. IX. The absorption of rubidium bromide by potato discs. Ann.Bot.N.S., 3, 427-454.
- STILES W. et DENT K.W.(1946).- Further observations on the absorption of manganese chloride by storage tissues. Ann.Bot.N.S., 10, 203-222.
- STILES W. et SKELDING A.D.(1940).- The salt relations of plant tissues. I. The absorption of potassium salts by storage tissues. Ann.Bot.N.S., 4, 329-363.
- STONIER T. (1969).- Studies on auxin protectors. VII. Association of auxin protectors with Crown-gall development in sunflower stems. Plant Physiol., 44, 1169-1174.
- STREET H.E.(1957).- Excised root culture. Biol.Rev., 32, 117-155.
- SUTCLIFFE J.F.(1952).- The influence of internal concentration on potassium accumulation and salt respiration of red beet root tissue. J. Exper.Bot., 3, 59-76.
- SUTCLIFFE J.F. et HACKETT D.P.(1957).- Efficiency of ion transport in biological systems. Nature, 180, 95-96.
- THELLIER M. (1968).- Essai d'interprétation électrocinétique du fonctionnement de mécanismes transporteurs ou enzymatiques spécialement dans le cas de l'oxydo-réduction. C.R.Acad.Sci., 266, 826-829.
- THELLIER M. (1969).- Interprétation électrocinétique de l'absorption minérale chez les végétaux. Bull.Soc.Fr. Phys.Vég., 15, 127-139.
- TRUELSEN T.A. (1967).- Indoleacetic acid induced decrease of the ribonuclease activity in vivo. Physiol. Plant., 20, 1112-1119.

- UHRSTRÖM I. (1969). - The time effect of auxin and calcium on growth and elastic modulus in hypocotyls. Physiol. Plant., 22, 271-287.
- ULEHLA V. (1928). - Vorversuche zur Kultur des Pflanzengewebes. I. Das Wasser als Faktor der Gewebekultur. Arch. f. exp. Zellf., 6, 370-417.
- UMBREIT W.W., BURRIS R.H. et STAUFFER J.F. (1957). - Manometric techniques : a manual describing method applicable to the study of tissue metabolism. Burgess Pub., Co., Minneapolis, 338 p.
- VALLEE M. (1963). - Recherches sur l'exsorption et l'absorption du rubidium par des racines excisées d'Orge. Thèse, Paris, 190 p.
- WACQUANT J.P. (1969). - Adsorption, absorption cationique préférentielle et écologie végétale. Bull. Soc. fr. Phys. Vég., 15, 237-251.
- WHITE Ph.R. (1939). - Recent contributions from excised plant tissue and organ culture studies to the science of plant physiology. Chron. bot., 5, 166-167.
- YODA S. et ASHIDA J. (1961). - Effect of auxin on the osmotic value in pea stem sections. Nature, 192, 577-578.
-



TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
HISTORIQUE	
I. <u>Absorption et exsorption</u>	3
II. <u>Influence de l'auxine sur les échanges</u>	5
III. <u>Influence de la nature du support sur la nutrition minérale</u>	6
TECHNIQUES UTILISEES	
I. <u>Techniques de culture</u>	
A) Culture des tissus	8
B) Culture des racines isolées	10
II. <u>Techniques de dosages</u>	
A) Utilisation d'isotopes radioactifs	12
B) Dosage du phosphore total	12
C) Séparation des principales formes de phosphore	13
D) Dosage de calcium et de potassium	15
E) Dosage d'azote	15
III. <u>Mesure de l'intensité respiratoire</u>	16

Première Partie

ABSORPTION ET EXSORPTION

Chapitre I :

ETUDE DE L'ABSORPTION

A) Absorption du phosphore	19
B) Absorption du calcium	19
C) Conclusion	21

Chapitre II :

ETUDE GENERALE DE L'EXSORPTION

A) Etude en milieu renouvelé et détermination du temps de lavage	23
B) Exsorption en milieu non renouvelé	25

Chapitre III :

INFLUENCE DES INHIBITEURS SUR L'ABSORPTION ET SUR L'EXSORPTION

A) Influence des inhibiteurs sur l'absorption . . .	33
B) Influence des inhibiteurs sur l'exsorption . . .	33
C) Conclusion	37

Chapitre IV :

<u>CALCUL DE L'ESPACE LIBRE</u>	39
---	----

Deuxième Partie

INFLUENCE DE L'AUXINE SUR L'ABSORPTION ET L'EXSORPTION

Chapitre V :

INFLUENCE DE L'AUXINE SUR L'ABSORPTION

A) Tissus de Carotte	42
B) Tissus de Crown-gall de Scorsonère	49
C) Racines isolées de Pois	49
D) Conclusion	52

Chapitre VI :

INFLUENCE DE L'AUXINE SUR L'EXSORPTION

A) Tissus de Carotte	53
B) Tissus de Crown-gall de Scorsonère	53
C) Racines isolées de Pois	59
D) Conclusion	61

Troisième Partie

INFLUENCE DES COLLOIDES SUR LA CROISSANCE ET L'ABSORPTION

Chapitre VII :

INFLUENCE DES COLLOIDES SUR LA CROISSANCE

A) Expériences avec la gélose	63
B) Expériences avec les bio-gels	64
C) Conclusion	68

Chapitre VIII :

INFLUENCE DES COLLOIDES SUR L'ABSORPTION

A) Expériences avec la gélose	69
B) Expériences avec les bio-gels	77
C) Expériences avec les silico-gels	77
D) Conclusion	80

Chapitre IX :

INFLUENCE DE LA NATURE DU SUPPORT SUR LA PROTEOGENESE ET L'INTENSITE RESPIRATOIRE

A) Influence des colloïdes sur la protéogénèse	81
B) Influence des colloïdes sur l'intensité respiratoire	81
C) Conclusion	82

DISCUSSION GENERALE	83
---------------------------	----

CONCLUSIONS GENERALES	89
-----------------------------	----

BIBLIOGRAPHIE	90
---------------------	----

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Vu et approuvé

Paris, le 23 JUIN 1970

Le Doyen de la Faculté des Sciences
de Paris

Marc . ZAMANSKY

Vu
et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

Robert MALLER

